



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

ULB

In vivo und in vitro Interaktionen haloarchaealer Gasvesikelproteine

Völkner, Kerstin

(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00011850>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen

Publikationstyp: Dissertation

Fachbereich: 10 Fachbereich Biologie

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/11850>

In vivo* und *in vitro
Interaktionen
haloarchaealer Gasvesikelproteine

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Dissertation von
Kerstin Völkner

Erstgutachterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Zweitgutachter: PD Dr. Arnulf Kletzin

Darmstadt 2020

Völkner, Kerstin: *In vivo* und *in vitro* Interaktionen haloarchaealer Gasvesikelproteine
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-118501
Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International

- Für alle, die mich unterstützt haben -

1. INHALT

1.	INHALT	I
2.	ZUSAMMENFASSUNG	1
3.	EINLEITUNG	3
3.1.	Halophile Archaea	3
3.2.	Halophile Proteine	4
3.3.	Der halophile Modellorganismus <i>Hfx. volcanii</i>	6
3.4.	Gasvesikel	7
3.4.1.	Biomedizinische Anwendung von Gasvesikeln	10
3.5.	Gasvesikel-kodierende Genregion	11
3.6.	Die akzessorischen Gasvesikelproteine	12
3.7.	Die Cellulose-Bindedomäne als Fusionstag zur Proteinisolation	14
3.8.	split-GFP als Reporter für Protein-Protein Interaktionen	15
3.9.	Ziel der Arbeit	17
4.	MATERIAL UND METHODEN	18
4.1.	Materialien	18
4.1.1.	Chemikalien und Hilfsmittel	18
4.1.2.	Enzyme und Kits	19
4.1.3.	Größenstandards	20
4.1.4.	Synthetische Oligonukleotide	20
4.1.5.	Verwendete Mikroorganismen	20
4.1.6.	Verwendete Plasmidvektoren	20
4.2.	Mikrobiologische Methoden	21
4.2.1.	Kultivierung der Mikroorganismen	21
4.2.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	21
4.2.3.	Transformation von <i>Haloferax volcanii</i>	22
4.3.	Molekularbiologische Methoden	22
4.3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
4.3.2.	Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide	24
4.3.3.	Molekularbiologische Standardtechniken	24

4.4. Proteinchemische Methoden	25
4.4.1. Herstellung halobakterieller Zellextrakte von hydrophoben Gasvesikelproteinen	25
4.4.2. Herstellung halobakterieller Zellextrakte für <i>in vitro</i> Protein-Protein-Interaktionsstudien	26
4.4.3. Herstellung von Gesamtzelllysate für native Affinitätschromatografie	26
4.4.4. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	27
4.4.5. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger	27
4.4.6. Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	28
4.4.7. Antikörperherstellung aus synthetischen Peptiden	28
4.4.8. Nachweis von Proteinen mittels <i>semi-dry</i> Western-Analysen	28
4.4.9. Rekombinante Expression und Reinigung von GvpX _{His} -Proteinen aus <i>E. coli</i>	30
4.4.10. Nachweis von <i>in vitro</i> Protein-Protein-Interaktionen über Affinitätschromatographie mit GvpX _{His} -Proteinen und halobakteriellen Lysaten	31
4.4.11. Pulldown-Assay mittels Cellulose-Bindedomäne-tag	31
4.4.12. Protein-Protein Interaktionsstudien mittels split-GFP	32
4.5. Mikroskopische Analysen	32
4.5.1. <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	32
4.5.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	33
5. ERGEBNISSE	34
5.1. Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gasvesikelproteine via 6x-Histidin-tag	34
5.2. Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gasvesikelproteine via Cellulose-Bindedomäne-tag	38
5.2.1. Reinigung der CBD-Fusionsproteine	39
5.2.2. Pulldown-Assay mittels Cellulose-Bindedomäne-tag	43
5.2.3. Isolation des putativen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine	48
5.3. <i>In vivo</i> Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteinen mittels split-GFP	49
5.3.1. Etablierung der split-GFP Methode	49
5.3.2. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit	53
5.3.3. Untersuchungen der Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteinen mittels split-GFP	55
5.3.4. Fragmentierung von GvpM und Untersuchung der Dimerisierung	56
5.3.5. Bestimmung putativer Interaktionsstellen in GvpM mit anderen Gvp-Proteinen	58
5.3.6. Untersuchung der Interaktion von GvpM mit anderen akzessorischen Gvps in Anwesenheit von GvpH	60
5.3.7. Bestimmung der Interaktionspartner von GvpA	63

5.4.	Mutagenesestudie von GvpM	64
5.4.1.	Untersuchung der <i>in vivo</i> Protein-Protein Interaktion von GvpM- Deletionsvarianten mit GvpF und GvpL	64
5.4.2.	Untersuchung von GvpM-Varianten im Bereich der putativen α -Helix 1	66
5.4.3.	Untersuchung des GAV/RAAIA-Motives	71
6.	DISKUSSION.....	74
6.1.	Zwei verschiedene Methoden zum <i>in vivo</i> Nachweis haloarchaealer Protein-Protein Interaktionen.....	74
6.1.1.	CBD-tag als <i>in vivo</i> Nachweis für Protein-Protein Interaktionen in <i>Hfx. volcanii</i>	75
6.1.2.	Split-GFP als <i>in vivo</i> Nachweis für Protein-Protein Interaktionen in <i>Hfx. volcanii</i>	75
6.2.	Das Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine.....	77
6.2.1.	Isolation eines möglichen Proteinkomplexes	77
6.2.2.	Das Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gvps und GvpA	78
6.2.3.	Der Einfluss von GvpH auf das Interaktionsverhalten der akzessorischen Gasvesikelproteine	80
6.3.	Die Interaktion von GvpM und GvpL.....	82
6.3.1.	GvpL interagiert mit der α -Helix 1 und den <i>loops</i> 1+2 von GvpM.....	83
6.3.2.	Die α -Helix 3 von GvpM ist für die Gasvesikelbildung und die L/M-Interaktion nicht essentiell	87
6.4.	Das Modell der Gasvesikelbildung.....	88
7.	FAZIT UND AUSBLICK	90
8.	LITERATUR	92
9.	ANHANG	102
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	118
11.	BEITRÄGE ANDERER.....	120
12.	PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE.....	121
13.	CURRICULUM VITAE	122
14.	DANKSAGUNG.....	123
15.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	124

2. ZUSAMMENFASSUNG

Die p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 besteht aus zwei entgegengesetzt orientierten Genclustern, *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM*, deren Expression zur Bildung von Gasvesikeln führt. Jedes dieser Gene kodiert für ein Gasvesikelprotein (Gvp). GvpA ist das Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle und GvpC stabilisiert diese. Den Proteinen GvpD und GvpE wird eine regulatorische Rolle zugesprochen. Dabei fungiert GvpE als Transkriptionsaktivator und GvpD als -repressor. Die Proteine GvpFGHIJKLM sind hingegen akzessorische Proteine, die in einem frühen Stadium der Gasvesikelbildung in geringer Menge gebildet werden. Möglicherweise sind die meisten der akzessorischen Gasvesikelproteine in der Gasvesikelstruktur integriert, da alle, bis auf GvpK, in einer Gasvesikelpräparation nachgewiesen werden konnten. Auch sind sie, bis auf GvpH und GvpI, essentiell für die Bildung eines gasgefüllten Vesikels. In vergangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass GvpM mit GvpH, GvpL oder GvpJ interagiert. Eine Interaktion von GvpM mit GvpG konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen wurden *in vitro* mit heterolog in *E. coli* produzierten ^{His}Gvp-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von Tavlaridou *et al.* begonnenen Interaktionsstudien fortgeführt. Bei der Reinigung der ^{His}Gvp-Fusionsproteine zeigten sich eine Vielzahl von Co-Präzipitaten in den Coomassie-Färbungen. Bei der Durchführung der Pulldown-Assays und anschließenden Western-Analysen wurden darüber hinaus Kreuzreaktionen der verwendeten Gvp-Antiseren gegenüber den ^{His}Gvp-Fusionsproteinen festgestellt. Aus diesem Grund konnten keine eindeutige Aussage über Interaktionen getroffen werden. Daher wurde eine Methode etabliert, die den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen unter nativen Bedingungen ermöglicht. Hierfür wurde die Cellulose-Bindedomäne (CBD) aus *Clostridium thermocellum* verwendet, da diese auch unter Hochsalzbedingungen stabil ist. Mit Hilfe dieser ist es nun erstmals möglich, Gasvesikelproteine in hoher Reinheit, ohne die Co-Präzipitation von Kontaminanten, zu isolieren. Zum Nachweis der Protein-Protein Interaktionen wurden die ^{CBD}Gvp-Fusionsproteine gemeinsam mit dem putativen Interaktionspartner in *Hfx. volcanii* synthetisiert und das Gesamtzelllysate über eine Cellulosematrix gereinigt. Die Ergebnisse der Western-Analysen zeigten, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine miteinander interagieren. Lediglich der Interaktionsnachweis von GvpL mit GvpH oder GvpI war uneindeutig. Diese Ergebnisse verifizieren die Ergebnisse von Tavlaridou *et al.* und zeigen zudem eine Interaktion zwischen GvpG und GvpM. Darüber hinaus wurde die CBD-Methode zum Nachweis eines putativen Proteinkomplexes aus all diesen Gvp-Proteinen verwendet. Dazu wurde GvpM mit der CBD fusioniert und zusammen mit den sieben akzessorischen Gasvesikelproteinen GvpF, GvpG, GvpH, GvpI, GvpJ, GvpK und GvpL in *Hfx. volcanii* co-synthetisiert. Dabei fungierte ^{CBD}M als *bait* (Räuber) Protein und die Proteine GvpF bis GvpL als *prey* (Beute) Proteine. Die Western-Analysen des Pulldown-Assays zeigten, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine mit ^{CBD}M isoliert werden konnten. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die akzessorischen Gasvesikelproteine möglicherweise einen oder mehrere Proteinkomplexe bilden können.

Zusätzlich wurden die Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteine und GvpA direkt *in vivo* mittels split-GFP untersucht. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass das salzstabile und modifizierte grün fluoreszierende Protein mGFP2 in zwei Teile zerlegt und die resultierenden Fragmente NGFP und CGFP jeweils an die putativen Interaktionspartner fusioniert wurden. Interagieren die beiden fusionierten Proteine (und gibt es keine sterischen Behinderungen), können beide GFP-Teile zu einem funktionalen Protein assemblieren. Die Interaktionsstärke kann schließlich über die relative Fluoreszenz (rf) ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten viele Interaktionen bestätigt und ein erstes Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine erstellt werden. Zudem zeigte sich, dass GvpA nur mit GvpF interagiert und dass GvpL womöglich eine zentrale Rolle im Proteinkomplex der akzessorischen Gasvesikelproteine spielt.

Darüber hinaus wurden die Interaktionsstellen in GvpM zu anderen Gvp-Proteinen näher definiert. Dazu wurden GvpM-Fragmente verwendet, die den N-terminalen Bereich (M25N) und den C-terminalen Bereich (M25C) repräsentieren und jeweils auf Interaktion mit den Proteinen GvpF bis GvpL hin untersucht. M25N interagiert hauptsächlich mit GvpI und GvpL und M25C hauptsächlich mit GvpF, GvpG, GvpH, GvpJ oder GvpK. Auch wurden bereits vorhandene GvpM-Deletionsvarianten auf Interaktion mit GvpF und GvpL untersucht, die ebenfalls zeigten, dass der N-terminale Bereich von GvpM wichtig für die L/M-Interaktion ist, während der C-terminale Bereich wichtig für die F/M-Interaktion ist.

Um die Interaktionsstellen auf einzelne Aminosäuren eingrenzen zu können, wurden GvpM-Varianten hergestellt und sowohl auf Gasvesikelbildung als auch auf Interaktionsfähigkeit mit GvpL untersucht. Durch den Vergleich der Auswirkung auf die Gasvesikelbildung und der Interaktionsfähigkeit mit GvpL wurden zwei Motive in GvpM identifiziert, die für die L/M-Interaktion von Bedeutung sind: das PETI-Motiv in der putativen α -Helix 1, und das GAV/RAAIA-Motiv in den *loops* zwischen α -Helix 1 und β -Faltblatt 1 und zwischen dem β -Faltblatt 2 und der α -Helix 2. Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich haben in den meisten Fällen sowohl einen negativen Effekt auf die Gasvesikelbildung als auch einen positiven Effekt auf die L/M-Interaktion. Offenbar hat eine verstärkte L/M-Interaktion einen negativen Einfluss auf die Gasvesikelbildung.

3. EINLEITUNG

3.1. Halophile Archaea

Halophile Archaea (Haloarchaea) gehören zusammen mit den Methanogenen zur Gruppe der Euryarchaeota in der Domäne der Archaea. Diese kommen in nahezu allen Habitaten und ökologischen Nischen auf der Welt vor und können polyextremophilen Bedingungen standhalten. So kommen Euryarchaeota meist an extremen Standorten wie Hydrothermalquellen, Salzseen, Salzwiesen, Salinen, Permafrost der Antarktis, Soleeinschlüsse tief im Untergrund und unter dem Meeresspiegel vor und müssen extremen Bedingungen wie Salzsättigung, Anaerobie, hoher UV- und ionisierender Strahlung, Kälte/Hitze, Austrocknung und toxischen Ionen standhalten. Es gibt Hinweise darauf, dass Archaeen bereits seit über drei Billionen Jahren existieren, noch bevor die Erde ihre Atmosphäre ausbildete (Hahn and Haug, 1986). Um an solch extremen Standorten überleben zu können, sind zahlreiche Anpassungsmechanismen nötig. Als Schutz vor UV-Strahlung besitzen sie C₄₀- bzw. C₅₀- Carotinoide, wie Lycopin oder Bacterioruberin, die in der Zellmembran integriert sind und als Antioxidans gegen reaktive Sauerstoffspezies dienen (Mandelli *et al.*, 2012). Aus diesem Grund erscheinen bei hoher Populationsdichte die Habitate der Haloarchaea und anderer halophiler Organismen orange bis rötlich gefärbt. Durch hohe Populationsdichten sinkt der Sauerstoffpartialdruck jedoch schnell im umgebenden Milieu, wodurch Sauerstoff als externer Elektronenakzeptor nicht mehr zur Verfügung steht. Aus diesem Grund sind die meisten Haloarchaea in der Lage, unter anoxischen Bedingungen Nitrat oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als externen Elektronenakzeptor zu verwenden oder Aminosäuren wie Arginin zu fermentieren (Hartmann *et al.*, 1980; Ruepp and Soppa, 1996; Müller and DasSarma, 2005; Sorokin *et al.*, 2017). Ein Vertreter der Haloarchaea, *Halobacterium (Hbt.) salinarum*, bildet zusätzlich unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck das Retinalprotein Bakteriorhodopsin. Bakteriorhodopsin ist eine licht-getriebene Protonenpumpe, die in Anwesenheit von Licht einen Protonengradient über die Membran aufbaut, mit dessen Hilfe die ATP-Synthase ATP generieren kann. Weitere Retinalproteine, die in der Phototaxis involviert sind, sensieren Licht verschiedener Wellenlängen, wodurch ein zusätzlicher Schutz vor oxidativen DNA-Schäden gegeben ist (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971; Oesterhelt and Stoeckenius, 1973; Hartmann and Oesterhelt, 1977; Henderson *et al.*, 1990; Yao and Spudich, 1992; Zhang *et al.*, 1996; Oesterhelt, 1998). Durch die Ausbildung von Flagellen (Archaeellen) und Gasvesikeln können halophile Archaeen, wie *Hbt. salinarum*, vor ständig verändernden Umweltbedingungen, bedingt durch bspw. Regen, fliehen und sich in Bereichen mit besseren Konditionen positionieren (Walsby, 1994).

Ein weiterer wichtiger Anpassungsmechanismus an Hochsalzbedingungen ist der Ausgleich des hohen osmotischen Druckes bedingt durch hohe Salzkonzentrationen im umgebenden Medium. So benötigen moderat halophile Organismen wie *Haloferax (Hfx.) volcanii* Salzkonzentrationen von 0,7 bis 3 M NaCl und das extrem halophile Archaeon *Hbt. salinarum* 2,5 M bis 5,2 M NaCl. Um dem hohen osmotischen Druck entgegen zu wirken, verwenden halophile Organismen zwei Strategien: die *salt-in*

Strategie und die Synthese von *compatible solutes* (Oren, 1999). Nur die wenigsten halophilen Organismen verwenden die *salt-in* Strategie, lediglich Vertreter der Halobacteriales, wie *Hfx. volcanii* und *Hbt. salinarum*, und in der Domäne der Bacteria Vertreter aus der Gruppe der Halanaerobiales (wie *Salinibacter*). Bei dieser Strategie wird die Konzentration von Natriumionen mit Hilfe von Na^+/H^+ -Antipportern im Zellinnern so gering wie möglich gehalten (Oren, 1999). Um dem osmotischen Druck jedoch standhalten zu können, akkumuliert die Zelle Kalium- und Chloridionen im Zellinnern, ähnlich der NaCl-Konzentration im umgebenden Medium. Diese Form von osmotischer Adaption kostet nur wenig Energie (Oren, 1999). Durch die hohe Salzkonzentration im Innern der Zelle müssen die intrazellulären Proteine jedoch adaptiert sein, um alle enzymatischen Systeme unter der hohen Salzbelastung aktiv zu halten. Die Verwendung von *compatible solutes* hingegen ist in allen drei Domänen weit verbreitet und die häufigste Form der Osmoadaption. Dabei werden organische Stoffe wie Glycerin, Aminosäuren oder deren Derivate wie Betain oder Ectoin oder einfache Zucker wie Saccharose oder Trehalose akkumuliert. Die Synthese der *compatible solutes* erfolgt je nach Salinität im Außenmedium, wodurch die Zelle auf wechselnde Salzkonzentrationen im Außenmedium reagieren kann. Durch die Verwendung dieser Strategie bleibt die Salzkonzentration im Cytoplasma im niedermolaren Bereich und eine Haloadaptation der intrazellulären Prozesse und Proteine ist nicht notwendig. Die Synthese der *compatible solutes* ist jedoch energetisch aufwendig (Oren, 1999). Es sind jedoch auch Mischformen beider Strategien bekannt. So nutzt *Hbt. salinarum* ebenfalls *compatible solutes* in Anwesenheit hoher molarer intrazellulärer KCl-Konzentrationen (Kokoeva *et al.*, 2002).

3.2. Halophile Proteine

Das Cytoplasma der Haloarchaea hat hochmolare Salzkonzentrationen, weshalb die biochemische Maschinerie an die extremen intrazellulären Bedingungen angepasst sein muss. Hochmolare Salzkonzentrationen beeinflussen die Proteinstabilität und -löslichkeit. Salzkonzentrationen, die die Löslichkeit begünstigen, destabilisieren in der Regel die gefaltete Form mesophiler Proteine und *vice versa* (Von Hippel and Schleich, 1969). Dabei stören hypersaline Bedingungen die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Aminosäureresten, was zu Proteinaggregaten und -entfaltung führen kann, und sind für die allgemeine Abnahme der Verfügbarkeit von Wassermolekülen verantwortlich (Zaccai and Eisenberg, 1990). Halophile Proteine bestechen jedoch durch die Eigenschaft, bei hohen Salzkonzentrationen sowohl löslich als auch stabil zu sein. In niedermolaren Lösungen können diese sogar ihre strukturelle Integrität verlieren (Madern *et al.*, 2000). Verglichen mit ihren mesophilen Homologen besitzen halophile Proteine einen höheren Anteil an sauren Aminosäuren (aa) (Lanyi, 1974). Durch die Carboxylgruppen der Aminosäurereste kann mehr Wasser gebunden werden, was die Ausbildung eines Salzionen-Netzwerkes begünstigt und die Löslichkeit in hypersalinen Bedingungen verbessert (Zaccai *et al.*, 1989; Eisenberg *et al.*, 1992; Dym *et al.*, 1995; Frolov *et al.*, 1996). Durch den hohen Anteil an sauren Aminosäuren besitzen halophile Proteine in der Regel einen niedrigen isoelektrischen Punkt (Karan *et al.*, 2012). Halophile Proteine binden Salzionen und Wasser in Mengen

ähnlich der Umgebung. Die Menge an Salz, die gebunden werden kann, ist dabei abhängig von der Anzahl der sauren Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins. Das zeigt sich auch im Laufverhalten bei der Polyacrylamidgelelektrophorese. Die halophilen Proteine laufen in der Regel bis zu 50 % langsamer als erwartet (Madern *et al.*, 2000). Halophile Proteine enthalten zudem weniger Lysin, vermehrt kleine hydrophobe (Glycin, Alanin, Valin) und weniger aliphatische Aminosäurereste (Madern *et al.*, 1995). Durch die Reduktion der aliphatischen Aminosäuren wird die Hydrophobizität der Proteinoberfläche verringert, wodurch das Innere des Proteins einen alkalischen Charakter erhält (Dym *et al.*, 1995; Frolow *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 1998; Bieger *et al.*, 2003). Ein Beispiel für Haloadaption ist das Ferredoxin aus *Hbt. salinarum*, welches über horizontalen Gentransfer übertragen wurde (Kerscher *et al.*, 1976; Pfeifer *et al.*, 1993). Im Vergleich zu seinem mesophilen Homolog besitzt das halophile Ferredoxin eine Insertion von 30 aa, die aus überwiegend negativ geladenen Aminosäureresten besteht. Die Hydrophobizität und Alkalinität des gesamten Proteins bleibt dabei unverändert, die Oberfläche des halophilen Proteins ist jedoch negativer mit deutlich weniger hydrophoben Aminosäuren. Durch diese Adaptionen behält das halophile Ferredoxin auch in hochmolaren Salzkonzentrationen seine Integrität. Eine genomweite Analyse zeigte, dass etwa 150 Gene diese Insertion besitzen (Hase *et al.*, 1980; Rao and Argos, 1981; Frolow *et al.*, 1996; Hirota *et al.*, 2005; Marg *et al.*, 2005). Nach heutigem Wissensstand kann keine eindeutige Aussage über eine salzabhängige Enzymaktivität getroffen werden. Beispielweise sinkt die Enzymaktivität der Malatdehydrogenase von *Haloarcula marismortui* mit steigender Salzkonzentration (Mevarech *et al.*, 1977), die Enzymaktivität der β -Galaktosidase von *Haloferax alicantei* steigt jedoch mit zunehmender Salzkonzentration (Holmes *et al.*, 1997). Die Enzymaktivität kann jedoch abhängig von der Art des Salzes sein. Bei steigender KCl-Konzentration steigt die Enzymaktivität einiger halophiler Enzyme, eine steigende NaCl-Konzentration kann diese wiederum negativ beeinflussen (Bischoff and Rodwell, 1996). Die zwei Aktivitäten der Katalase-Peroxidase aus *Hbt. salinarum* weisen sogar unterschiedliche Abhängigkeiten von NaCl auf (Brown-Peterson and Salin, 1993).

Der Überschuss an sauren Aminosäuren der halophilen Proteine und die daraus resultierende negative Oberflächenladung ist entscheidend für die Löslichkeit in hohem Salzgehalt. Dies erschwert jedoch die Isolierung haloadaptierter Proteine mittels standard-chromatographischen Methoden. Eine etablierte Methode ist die Verwendung von Ammoniumsulfat zur Fixierung der Proteine an eine Sepharose-Matrix und anschließender Elution mit sinkendem Ammoniumsulfat-Gradienten (Mevarech *et al.*, 1976). Zudem kann diese Eigenschaft zu Problemen bei der Synthese in heterologen Wirten wie *E. coli* führen, da sich halophile Proteine unter Bedingungen geringer Ionenstärke typischerweise fehlfalten und aggregieren (Blecher *et al.*, 1993; Cendrin *et al.*, 1993). Die Reinigung halophiler Enzyme aus *E. coli* geschah oft über die Gewinnung von unlöslichem Protein aus *inclusion bodies*, gefolgt von Denaturierung und Rückfaltung in Hypersalinlösungen (Connaris *et al.*, 1999). Die Renaturierung erfolgt meist durch sinkende Harnstoff- und steigende Kaliumchloridkonzentrationen. Eine erfolgreiche Renaturierung konnte bereits für die Glukosedehydrogenase aus *Hfx. mediterranei* und für ein TBP-Protein aus *Hbt. salinarum* nachgewiesen werden (Soppa and Link, 1997; Pire *et al.*, 2001). Die Renaturierung ist jedoch nicht in allen Fällen erfolgreich (Connaris *et al.*, 1999). Aus diesem Grund haben es sich einige Forschungsgruppen zur Aufgabe gemacht, halophile Proteine nativ zu

synthetisieren und in Anwesenheit hochmolarer Salzkonzentrationen zu reinigen. Mit Hilfe eines 6xHistidin-tags und Metall-Affinitätschromatographie konnte RadA aus *Hfx. volcanii* erfolgreich isoliert werden (Allers *et al.*, 2010). Zusätzlich konnten die Signalpeptidasen Sec11a und Sec11b aus *Hfx. volcanii* unter Verwendung der Cellulose-Bindedomäne aus *Clostridium thermocellum* und einer Cellulosematrix isoliert werden (Fine *et al.*, 2006).

3.3. Der halophile Modellorganismus *Hfx. volcanii*

Haloferax volcanii, zunächst publiziert unter dem Namen *Halobacterium volcanii*, ist ein moderat halophiles Archaeon, das aus dem Toten Meer isoliert und nach Benjamin Elazari Volcani benannt wurde (Mullakhanbhai and Larsen, 1975). Für ein optimales Wachstum benötigt es Salzkonzentrationen von 1,7 bis 2,5 M NaCl und Temperaturen zwischen 42 °C und 45 °C. Der Organismus ist chemoorganotroph (verwendet Polysaccharide, Zucker und Aminosäuren als Kohlenstoffquelle) und fakultativ anaerob (Mullakhanbhai and Larsen, 1975). Die Verdopplungszeit im Komplexmedium mit Hefeextrakt beträgt 3 bis 4 Stunden. Das Genom des Stammes *Hfx. volcanii* DS2 ist seit 2010 vollständig sequenziert (Hartman *et al.*, 2010). Die Zellen besitzen jeweils ein Hauptchromosom (2,9 Mb), drei sekundäre Chromosomen (pHV1, 3, 4; 85-690 kb) und das Plasmid pHV2 (6,4 kb). Zudem sind sie polyploid, mit bis zu 25 chromosomalen Kopien (Soppa, 2011). Die Zellen sind scheibenförmig und pleomorph und haben einen Durchmesser von etwa 1-3 µm.

Aufgrund einer Reihe genetischer und biochemischer Werkzeuge wie Gen-Knockout-Systemen (Bitan-Banin *et al.*, 2003), verschiedenen Antibiotikaresistenz- und auxotrophen Markern (Lam and Doolittle, 1989; Holmes *et al.*, 1991; Ortenberg *et al.*, 2002; Allers *et al.*, 2004), Reportergenen wie β -Galactosidase (Gregor and Pfeifer, 2001) und GFP (Reuter and Maupin-Furlow, 2004), einem induzierbaren Promotor (Large *et al.*, 2007) und verschiedenen *shuttle*-Vektoren (Lam and Doolittle, 1989; Pfeifer *et al.*, 1994; Allers *et al.*, 2010) hat sich *Hfx. volcanii* als Modellorganismus im Studium haloarchaealer Genfunktionen und Proteine etabliert. Er ist im Vergleich zu *Hbt. salinarum* leichter zu transformieren und hat eine deutlich geringere Verdopplungszeit (*Hfx. volcanii* 3-4 h; *Hbt. salinarum* 7,5 h). Für die Erforschung haloarchaealer Gasvesikel ist *Hfx. volcanii* sehr gut geeignet, da es keine Gasvesikelgene besitzt und daher nicht in der Lage ist Gasvesikel zu bilden. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden *shuttle*-Vektoren konnten in vergangenen Studien verschiedene Mutationen in Gasvesikelproteinen eingefügt und ihre Auswirkung auf die Gasvesikelbildung und -morphologie untersucht werden (Beard *et al.*, 2002; Strunk *et al.*, 2011; Tavlaridou *et al.*, 2014; Knitsch *et al.*, 2017). Durch die unterschiedlichen Replikationsursprünge und Antibiotikaresistenzen auf den Plasmiden ist es möglich, *Hfx. volcanii* mit zwei Plasmiden simultan zu transformieren. Der *shuttle*-Vektor pWL102 besitzt eine Mevinolin-Resistenz und den pHV2 ori (Lam and Doolittle, 1989). Der *shuttle*-Vektor pJAS35 hingegen besitzt eine Novobiocin-Resistenz, den pHK2 ori und zur Überexpression von Genen den Ferredoxin(*P_{fdx}*)-Promotor (Pfeifer *et al.*, 1994). Beide *shuttle*-Vektoren haben ähnliche chromosomale Kopienzahlen von unter 10 (Charlebois *et al.*, 1987; Holmes and Dyll-Smith, 1990).

Darüber hinaus kann GFP als Reportergen in *Hfx. volcanii* eingesetzt werden. Das an Hochsalz adaptierte smRS-GFP wurde bereits in *in vivo* Untersuchungen zum Proteinabbau durch Proteasomen (Reuter and Maupin-Furlow, 2004) und dem durch GvpD vermittelten GvpE-Abbau (Schmidt and Pfeifer, 2013) verwendet. Die Substitutionen S65T, Q80R, F99S, M153T und V163A sorgen für eine bessere Faltungsstabilität in hochmolaren Salzlösungen und einem „red-shift“ in der Wellenlänge zur Minimierung der Autofluoreszenz verursacht durch inkorporierte Carotinoide in der Zellmembran der Wirtszelle (Reuter and Maupin-Furlow, 2004). Für die *in vivo* Analyse von haloarchaealen Promotorstärken wurde mGFP2 entwickelt, ein Derivat des smRS-GFPs, das die zusätzliche Substitution F64L trägt (Born and Pfeifer, 2019). Dadurch ist die detektierte Fluoreszenz 2,5-fach erhöht im Vergleich zum smRS-GFP (Born and Pfeifer, 2019).

Ein Expressions- und Reinigungssystem zur nativen Proteinreinigung ist ebenfalls in *Hfx. volcanii* verfügbar. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des durch Zugabe von Tryptophan induzierbaren *p.tnA*-Promotors und die Proteinreinigung erfolgt mittels 6xHistidin-*tag* (Allers *et al.*, 2010). Zur Reduktion von Kontaminanten mit Histidin-reichen Sequenzen (PitA und cdc48d), wurden *Hfx. volcanii*-Expressionsstämme generiert, die modifizierte Varianten der Kontaminanten synthetisieren (Allers *et al.*, 2010). Die Modifikationen führen zu einer Reduktion der Histidine in der Aminosäuresequenz. Ebenso erwies sich die Verwendung der Cellulose-Bindedomäne (CBD) aus *Clostridium thermocellum* und einer Cellulosematrix als salzstabil und wurde zu Proteinreinigung halophiler Proteine aus *Hfx. volcanii* verwendet (Irihimovitch and Eichler, 2003; Fine *et al.*, 2006; Schlesner *et al.*, 2012).

3.4. Gasvesikel

Gasvesikel sind intrazelluläre und gasgefüllte Nanostrukturen, die ausschließlich aus Proteinen aufgebaut sind. Sie werden überwiegend von aquatischen Organismen aus der Domäne der Bacteria und Archaea gebildet und helfen den Organismen sich in der Wassersäule zu positionieren, um in Bereiche mit optimalen Wachstumsbedingungen zu gelangen. Nur acht von 137 Spezies aus der Domäne der Archaea bilden Gasvesikel (Oren, 2013). Darunter zählen die Organismen *Halobacterium salinarum*, *Haloferax mediterranei* und *Haloquadratum walsbyi*. In der Domäne der Bacteria werden Gasvesikel von den meisten Cyanobakterien gebildet, sind aber in der gesamten Domäne weit verbreitet (Walsby, 1994; Pfeifer, 2012). Gasvesikel kommen häufig in Gruppen, den sogenannten Gasvakuolen, vor, die als lichtreflektierende Strukturen in den Zellen mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops erkennbar sind. Diese Gasvakuolen wurden erstmals in der Untersuchung von Wasserblüten von Heinrich Klebahn beschrieben (Klebahn, 1895). Gasvesikel unterscheiden sich innerhalb der Domäne und Phyla durch ihre Form und Durchmesser. In halophilen Archaea sind Gasvesikel zumeist zylinder- oder spindelförmig mit einer Länge von bis zu 1,5 µm und einem Durchmesser von 0,2 bis 0,25 µm. Die Gasvesikelhülle wird durch helikale Aggregation des Hauptstrukturproteins GvpA gebildet (Abbildung 1). Dabei entstehen 4,6 nm breite Rippen, die im

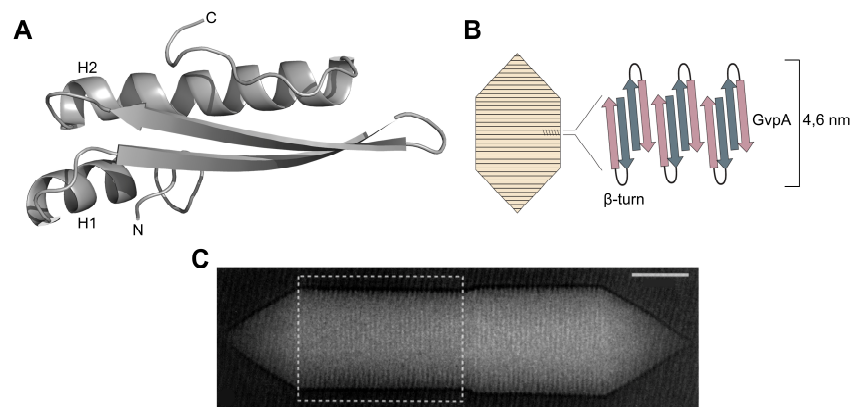


Abbildung 1: Die Struktur von GvpA und seine mögliche Anordnung im Gasvesikel. **A** Dreidimensionales Strukturmodell von GvpA, vorgeschlagen durch *de novo modelling* des haloarchaealen mc-vac GvpA (Strunk *et al.*, 2011). Die Helices H1 und H2 sind gekennzeichnet. C, Carboxyl-Terminus; N, Aminoterminus. **B** Schematische Darstellung der antiparallelen Aggregation von zwei GvpA-Monomeren zur Ausbildung der Rippenstruktur. Die β -sheets sind in rosa und grün gekennzeichnet. Die beiden α -helikalen Regionen von GvpA sind nicht berücksichtigt (nach Pfeifer, 2012). **C** Cryo-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gasvesikels aus *Hbt. salinarum* PHH1. Erkennbar sind die Rippen, die senkrecht zur Längsachse verlaufen. Der Maßstab ist 50 nm (Offner *et al.*, 1998).

rechten Winkel zur Längsachse verlaufen (Offner *et al.*, 1998). Die Gasvesikelhülle besitzt eine Dicke von 2 nm und wird durch Adhäsion von GvpC an der Außenseite stabilisiert (Walsby and Hayes, 1988; Englert and Pfeifer, 1993; Walsby, 1994). Das Äußere der Gasvesikelhülle besitzt einen hydrophilen Charakter und die der Gasphase zugewandte Oberfläche einen hydrophoben, wodurch Wassermoleküle im Innern des Gasvesikels nicht präzipitieren können. Der Gasaustausch erfolgt mittels Diffusion (Walsby, 1994). Cyanobakterielle Gasvesikel hingegen sind kleiner im Durchmesser (75-133 nm) und erreichen Längen von unter einem μm (Walsby, 1994). Die unterschiedlichen Größen und Morphologien liegen in den unterschiedlichen Habitaten, in denen die Gasvesikel-Produzenten leben, begründet. Durch das Ausüben von Druck können Gasvesikel irreversibel kollabieren (Bowen and Jensen, 1965). Dabei korreliert der kritische Druck, der aufgebracht werden muss, um den Gasvesikel kollabieren zu lassen, mit dem Durchmesser des Gasvesikels. So kollabiert ein Gasvesikel mit großem Durchmesser bereits bei niedrigem Druck und *vice versa*. Organismen aus tieferen Gewässern bilden Gasvesikel mit geringeren Durchmessern aus, als Organismen, die nur in 1 m Tiefe leben (Walsby, 1994). Dabei variiert der mittlere kritische Druck von unter 0,1 MPa (1 bar) in Halobacteria und über 3,5 MPa (35 bar) im ozeanischen Cyanobakterium *Trichodesmium thiebautii*. Zudem ist durch die Verwendung der *salt-in* Strategie kaum Turgordruck innerhalb haloarchaealer Zellen vorhanden, wodurch der Durchmesser der Gasvesikel größer sein kann. Die Bildung der Gasvesikel erfolgt durch Selbstorganisation der involvierten Proteine (Walsby and Fogg, 1969). Es wird vermutet, dass zunächst eine bikonische Struktur gebildet und auf einen bestimmten Durchmesser vergrößert wird. Der daran anschließende Zylinder wird möglicherweise von der Mitte heraus durch die Inkorporation von GvpA verlängert, bis der reife Gasvesikel seine terminale Länge erreicht (Waaland and Branton, 1969; Tavaridou *et al.*, 2014).

Die Bildung von Gasvesikeln ist abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren. Bei erhöhter Lichteinstrahlung und der daraus resultierenden hohen UV-Exposition ist die Gasvesikelbildung bspw. in Cyanobakterien reduziert, bei wenig Licht kommt es zu einer vermehrten Produktion von Gasvesikeln,

um den Auftrieb zu erhöhen. Zusätzlich produzieren Cyanobakterien Kohlenhydrate bei hoher Lichteinstrahlung, die in der Zelle akkumuliert werden und zusammen durch Reduktion der Gasvesikelmenge das Sinken veranlassen (Shear and Walsby, 1975; Walsby, 1994). Zudem ist die Gasvesikelbildung abhängig von der Temperatur. Die meisten Gasvesikel-Produzenten sind mesophile Organismen und gedeihen bei Temperaturen von 25 bis 40 °C. Bei erhöhten Temperaturen von 56 °C bleibt die Gasvesikelbildung aus, bei niedrigen Temperaturen von 15 °C kommt es zu einer erhöhten Produktion (Coker and Dassarma, 2007; Bleiholder *et al.*, 2012). Auch der Salzgehalt im umgebenden Medium spielt eine Rolle für die Gasvesikelbildung mancher Mikroben. *Hfx. mediterranei* bildet Gasvesikel bei Salzkonzentrationen von 17 bis 30 %, ab einer Salzkonzentration von 15 % werden dagegen keine Gasvesikel gebildet (Englert *et al.*, 1990). Dies ist eine wichtige Eigenschaft, um sich bspw. vor Regen und den daraus resultierenden erniedrigten Salzkonzentration nahe der Oberfläche zu flüchten.

Unter anoxischen Bedingungen können Haloarchaeen mit Nitrat als terminalem Akzeptor atmen oder Arginin fermentieren. Unter diesen Bedingungen ist die Gasvesikelbildung stark reduziert. Die Verstoffwechslung von DMSO oder TMAO hat jedoch keinen Einfluss auf die Gasvesikelbildung (Hechler and Pfeifer, 2009; Dassarma *et al.*, 2012). Auch die Verfügbarkeit verschiedener Zucker kann einen Einfluss haben. So reduziert sich die Gasvesikelmenge bei steigender Glukosemenge, ab einer Konzentration von etwa 100 mM sind keine Gasvesikel mehr zu sehen. Ähnlich verhält es sich mit Maltose und Saccharose. Andere Zuckerverbindungen wie Xylose, Arabinose oder Pyruvat haben keinen Effekt auf die Gasvesikelbildung (Hechler *et al.*, 2007).

Gasvesikel-produzierende Zellen können sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch leicht erkannt werden (Abbildung 2). In stationären Flüssigkulturen flotieren gasvesikulierte Zellen an die Oberfläche und bilden einen rosafarbenen Ring (Abbildung 2A). Kolonien Gasvesikel-produzierender Zellen erscheinen auf Festmedium milchig und weißlich-rosa, statt durchsichtig und orange-rot (Abbildung 2B). Im Phasenkontrastmikroskop können Gasvesikel anhand von Gasvakuolen, die lichtreflektierende Strukturen innerhalb der Zelle ausbilden, identifiziert werden (Abbildung 2C).

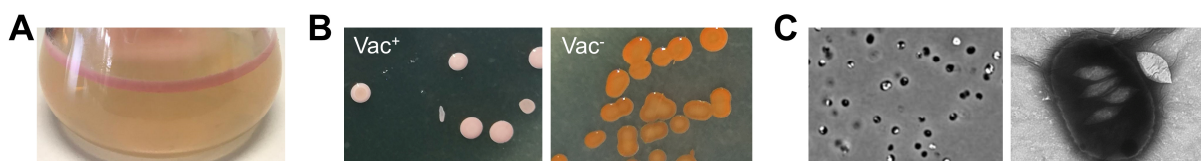


Abbildung 2: Makro- und mikroskopische Aufnahmen von *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten. **A** Flüssigkultur von *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die p-vac Region (*gas vacuole coding region*) exprimieren. Gasvesikulierte Zellen flotieren an die Oberfläche und bilden einen weißlichen bis rosafarbenen Ring. Gasvesikel-negative Zellen sinken an den Boden des Kulturgefäßes. **B** Makroskopische Aufnahmen von *Hfx. volcanii*-Transformanten auf Festmedium. Links: rosafarbene Kolonien von Transformanten, die Gasvesikel ausbilden (Vac⁺); rechts: orangefarbene Kolonien von Transformanten, die keine Gasvesikel ausbilden (Vac⁻). **C** Mikroskopische Aufnahmen von *Hfx. volcanii*-Transformanten mit Vac-positiven Phänotypen. Links: Gasvakuolen (Zusammenschluss mehrerer Gasvesikel) zeigen sich in phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen durch lichtbrechende Strukturen innerhalb der Zellen. Rechts: elektronenmikroskopische Aufnahme einer Vac-positiven Zelle. Innerhalb der Zelle sind vier Gasvesikel zu sehen, ein weiterer Gasvesikel befindet sich außerhalb der Zelle.

3.4.1. Biomedizinische Anwendung von Gasvesikeln

Gasvesikel finden bereits in einigen Forschungsgebieten Anwendung. Ein Anwendungsbereich ist die Impfstoffforschung, in der Gasvesikel zur Antigen-Exponierung bei der Antikörperherstellung verwendet werden (Stuart *et al.*, 2001). Gasvesikel sind genetisch veränderbar und leicht zu isolieren. Durch Fusionierung verschiedener Peptide an den C-Terminus von GvpC, das an der Außenseite der Gasvesikelhülle assoziiert ist, können diese an der Oberfläche präsentiert und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt werden (Stuart *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2004). Durch die Verwendung der ausschließlich aus Proteinen aufgebauten Gasvesikel als Adjuvans kann der Effekt, verursacht durch das Einschleusen fremder Nukleinsäuren oder Lipide durch virale oder Phagen-bezogene Impfstoffe, vermieden werden. Die rekombinanten Gasvesikel sind nicht toxisch für Mensch und Tier, wodurch sie sowohl oral als auch parenteral Anwendung finden. Zudem sind sie kostengünstig, schnell zu isolieren und sehr stabil. Dieses Verfahren führt zu einer langlebigen Antikörperreaktion und wurde eingesetzt, um Antikörper gegen Peptide des SIV (Simiane Immundefizienz-Virus) zu entwickeln (Stuart *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2004; Sremac and Stuart, 2008; 2010). Ein weiteres Beispiel für die GvpC-vermittelte Repräsentation von Peptiden ist die Fusionierung von GvpC mit Proteinen der äußeren Membran von *Chlamydia trachomatis*. Die gebildeten Antikörper sind in der Lage, den Erreger in Seren von *Chlamydia*-positiven Patienten nachzuweisen (Childs and Webley, 2012). Eine weitere interessante Anwendung von Gasvesikeln könnte die Verwendung als Medikamententransportsystem sein. *In vitro* Diffusionsstudien mit Schweinehaut haben gezeigt, dass Gasvesikel, die mit Hilfe von Mikronadeln injiziert wurden, leicht durch die Haut gelangen. Somit könnten Gasvesikel verwendet werden, um protein- oder peptidbasierte Medikamente in Mammalia zu transportieren. Weitere Forschungsarbeiten sind jedoch notwendig (Andar *et al.*, 2017).

Überdies finden Gasvesikel biomedizinisch Anwendung in der Kontrastmittelforschung. Konventionelle Kontrastmittel beinhalten sogenannte *microbubbles*, die mit unterschiedlichen Gasen gefüllt und durch Lipide oder Proteine stabilisiert sind. Da der Partialdruck-Gradient zwischen der Innenseite der *microbubbles* und dem Außenmedium umgekehrt proportional zum Radius ist, sind diese limitiert auf Größen von maximal 1 μm . Kleinere Partikel erwiesen sich als instabil in *in vivo* Anwendungen (Shapiro *et al.*, 2014a). Aufgrund ihrer Eigenschaft finden *microbubbles* häufig Anwendung in vaskulären Systemen, für feinere Gewebe oder Organe erwiesen sie sich als ungeeignet (Shapiro *et al.*, 2014a). Gasvesikel hingegen sind mit Längen von 100-600 nm und Durchmessern von 40-250 nm wesentlich kleiner. Da umgebende Gase mittels Diffusion in die Gasvesikel gelangen, existiert kein Druckgradient und die Gasvesikel sind trotz ihrer kleinen Größe sehr stabil. Dies macht die Gasvesikel bei akustischen Drücken, die bis zu 9-fach höher sein können als der kritische hydrostatische Druck, stabil (Cherin *et al.*, 2017). Auch bei der *in vivo* Anwendung in einer Maus-Leber zeigten sich Gasvesikel als Kontrastmittel geeignet (Shapiro *et al.*, 2014a). Zudem können Gasvesikel als alternatives Kontrastmittel in der Magnetresonanzbildgebung (MRI) verwendet werden (Shapiro *et al.*, 2014b; Lakshmanan *et al.*, 2016; Farhadi *et al.*, 2018). Konventionelle MRI-Kontrastmittel sind potentiell toxisch und benötigen zur Detektion relativ hohe Konzentrationen (μM -Bereich). Gasvesikel hingegen, die mit hyperpolarisiertem $^{129}\text{Xenon}$ gefüllt sind, sind über HyperCEST (*hyperpolarized*

chemical exchange saturation transfer) bereits im picomolaren Bereich detektierbar (Lakshmanan *et al.*, 2017). Durch Modifikationen der Gasvesikel können diese eingesetzt werden, um bspw. HER2-synthetisierende Brustkrebs-Zelllinien zu markieren, um diese mittels MRI von anderen Zelllinien unterscheidbar zu machen (Shapiro *et al.*, 2014b).

Eine weitere Anwendung von Gasvesikeln ist das nicht-invasive Imaging von Mikroben im Mikrobiom von Mammalia (Bourdeau *et al.*, 2018). Es wurden Gasvesikel entwickelt, die von Enterobacteriaceen wie *E. coli* gebildet werden können. Dazu wurden die Gene *gvpR*, *N*, *F*, *G*, *L*, *S*, *K*, *J*, *T* und *gvpU* aus *Bacillus megaterium* mit den Strukturgenen *gvpA* und *gvpC* aus *Anabaena flos-aquae* komplementiert. Das resultierende ARG1 (*acoustic reporter gene* 1) zeigte in *E. coli* ein robustes Ultraschallsignal. Um verschiedene Population zeitgleich zu visualisieren, wurde ein weiterer Reporter entwickelt, das ARG2. Durch verkürztes GvpC kollabieren ARG2-Gasvesikel bei geringerem hydrostatischem oder Ultraschalldruck, wodurch der ARG2- vor dem ARG1-Kontrast erlischt. ARG1 wurde zur nicht-invasiven Visualisierung von *E. coli* Nissle 1917 im Gastrointestinaltrakt einer Maus erfolgreich eingesetzt (Bourdeau *et al.*, 2018).

3.5. Gasvesikel-kodierende Genregion

Haloarchaeale Gasvesikel werden von der sogenannten vac-Region gebildet (*gas vacuole coding region*). Je nach Organismus unterscheiden sich die vac-Regionen durch unterschiedliche Transkriptionszeitpunkte und der Morphologie der daraus resultierenden Gasvesikel. *Halobacterium salinarum* PHH1 besitzt zwei vac-Regionen: die p-vac Region, die auf dem Megaplasmid pHH1 und die c-vac Region, die auf einem Mini-Chromosom lokalisiert ist. Gasvesikel der c-vac Region sind zylinderförmig und werden in der stationären Wachstumsphase gebildet. Da diese jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit war, wird im Weiteren auf eine detaillierte Darstellung der c-vac Region verzichtet. Die p-vac Region ist etwa 9 kbp groß und enthält 14 *gvp*-Gene, die jeweils für ein Gasvesikelprotein (Gvp) kodieren und in zwei entgegengesetzt orientierten Genclustern angeordnet sind: *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* (Abbildung 3) (Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). Die

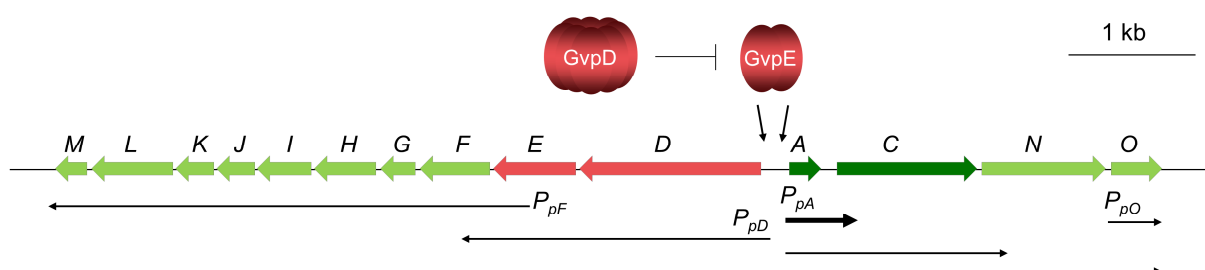


Abbildung 3: Schematische Darstellung der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1. Dargestellt sind die einzelnen *gvp*-Gene angeordnet auf einem Operon, das in zwei entgegengesetzte Cluster orientiert ist. In dunkelgrün dargestellt sind die Hauptstrukturproteine GvpA und GvpC. Hellgrün sind die akzessorischen Gasvesikelproteine dargestellt und in rot die regulatorischen Proteine GvpE und GvpD. Die Länge und Stärke der schwarzen Pfeile unterhalb der p-vac Region geben die Länge und Menge der einzelnen gebildeten Transkripte an. Ebenfalls sind die Promotoren (P_{pF} , P_{pD} , P_{pA} , P_{po}) angegeben, die die Bildung der jeweiligen Transkripte induzieren.

p-vac Region steht unter der Kontrolle von vier Promotoren (P_{pA} , P_{pD} , P_{pF} , P_{pO}) und führt zu spindelförmigen Gasvesikeln über den gesamten Wachstumszeitraum (Hofacker *et al.*, 2004). Die divergenten Promotoren P_{pA} und P_{pD} stehen unter der Kontrolle der regulatorischen Proteine GvpE und GvpD. GvpE aktiviert den Transkriptionsstart und die Anwesenheit von GvpD reguliert die Menge an gebildetem GvpE (Englert *et al.*, 1992b; Pfeifer *et al.*, 1994; Zimmermann and Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004; Scheuch *et al.*, 2008; Schmidt and Pfeifer, 2013). Somit reguliert GvpD indirekt das Maß der *gvp*-Transkription. Durch die Aktivierung der beiden divergenten Promotoren P_{pA} und P_{pD} wird die Transkription der *gvpA*-, *gvpACN*-, *gvpACNO*- und *gvpDE*-mRNA verstärkt. Dabei werden große Mengen der *gvpA*-mRNA und nur geringe Mengen der *gvpACN*- und *gvpACNO*-mRNA bis zur stationären Wachstumsphase gebildet. Die Bildung der *gvpDE*-mRNA erfolgt hauptsächlich spät-exponentiell (Offner and Pfeifer, 1995; Kruger and Pfeifer, 1996; Offner *et al.*, 1996; Roder and Pfeifer, 1996; Gregor and Pfeifer, 2001; Hofacker *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2008). Die zusätzlichen Promotoren P_{pF} und P_{pO} sind unabhängig von GvpE und kontrollieren die Bildung der *gvpFGHIJKLM*- und *gvpO*-mRNA (Hofacker *et al.*, 2004). Durch den P_{pO} -Promotor wird die *gvpO*-mRNA über die gesamte Wachstumsphase gebildet. Die Funktion von GvpO ist jedoch bisher unbekannt (Offner *et al.*, 1996). Der P_{pF} -Promotor induziert die Bildung der *gvpFGHIJKLM*-mRNA, was zur Bildung der sogenannten akzessorischen Gasvesikelproteine führt. Diese werden in geringen Mengen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gebildet und sind entscheidend in den initialen Phasen der Gasvesikelbildung (Offner and Pfeifer, 1995; Offner *et al.*, 2000; Hofacker *et al.*, 2004; Marschaus and Pfeifer, 2012).

3.6. Die akzessorischen Gasvesikelproteine

Zu den akzessorischen Gasvesikelproteinen zählen die Proteine GvpF bis GvpM, aber auch die Proteine GvpN und GvpO. In Komplementationsstudien, bei denen einzelne *gvp*-Leserahmen in der p-vac Region deletiert wurden, wurde gezeigt, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine, bis auf GvpH, GvpI und GvpN, essentiell für die Bildung eines gasgefüllten Vesikels sind (Offner *et al.*, 2000). ΔH -Transformanten wiesen Wildtyp-ähnliche Gasvesikel auf, die jedoch sehr instabil waren. Daher wird GvpH eine stabilisierende Funktion zugeschrieben. GvpI ist vermutlich an der Längenbestimmung der Gasvesikel beteiligt, da Transformanten, die die p-vac Region mit deletiertem *gvpI*-Leserahmen exprimierten, deutlich längere und weniger Gasvesikel produzierten. Die Deletion von *gvpN* aus der p-vac Region führte im Gegenzug dazu zu sehr kleinen Gasvesikeln. GvpN besitzt ein *p-loop* Motiv, das in ATP- bzw. GTP-bindenden Proteinen gefunden wird. Möglicherweise fungiert es als Chaperon für die GvpA-Assemblierung bei der Gasvesikelbildung. Die Deletion der restlichen akzessorischen Gasvesikelproteine führte zu Gasvesikel-negativen (Vac⁻) Phänotypen (Offner *et al.*, 2000). Die Struktur und Funktion der meisten akzessorischen Gasvesikelproteine ist weitestgehend unklar. Von den haloarchaealen Gasvesikelproteinen GvpF und GvpL, die Sequenzähnlichkeiten von etwa 35 % aufweisen, konnten anhand der Kristallstruktur des cyanobakteriellen GvpF von *Microcystis aeruginosa*

(Xu *et al.*, 2014) Homologiemodelle erstellt werden (Winter *et al.*, 2018). Diese Modelle zeigen, dass GvpL und GvpF trotz ihrer relativ geringen Aminosäuresequenzähnlichkeit strukturell sehr ähnlich sind. Beide besitzen zwei Domänen mit einer α + β -Struktur (Abbildung 4B), wobei GvpL gegenüber GvpF zwei zusätzliche Strukturbereiche besitzt (Winter *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurden weitere Homologiemodelle der akzessorischen Gasvesikelproteine mit Hilfe des I-Tasser Servers erstellt (Kerstin Völkner, unveröffentlicht). Diese Modelle zeigen, dass GvpG und GvpK, sowie GvpI, strukturell ähnlich sind und überwiegend aus α -Helices bestehen (Abbildung 4B). GvpG und GvpK sind Proteine mit amphiphilem Charakter und weisen eine hydrophobe N- und eine hydrophile C-terminale Hälfte auf. Es wird vermutet, dass sie entweder einen Teil der Gasvesikelstruktur bilden oder als Chaperone die Löslichkeit der hydrophoben Gasvesikelproteine ermöglichen (Englert *et al.*, 1992a; Offner and Pfeifer, 1995). GvpI hingegen besitzt einen äußerst hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren, vor allem im N-terminalen Bereich des Proteins (ca. 40 %). Anders als bei den meisten akzessorischen Gasvesikelproteinen, bei denen der theoretische isoelektrische Punkt im Mittel bei etwa pH 4 liegt, liegt der theoretische isoelektrische Punkt von GvpI bei pH 10. Darüber hinaus wurden mit Hilfe des *in silico* Strukturmodells von GvpA (Strunk *et al.*, 2011) Homologiemodelle der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpM und GvpJ erstellt (Abbildung 4B). Diese Proteine sind sehr hydrophob und zeigen Sequenzähnlichkeiten untereinander und mit GvpA (48 % GvpA/GvpM; 50 % GvpA/GvpJ; 60 % GvpJ/GvpM) (Tavlaridou *et al.*, 2014). Diese Sequenzähnlichkeiten konnten vor allem in Bereichen identifiziert werden, die im *in silico* Strukturmodell von GvpA auf die Kontaktflächen zu benachbarten Rippen hindeuten (Strunk *et al.*, 2011).

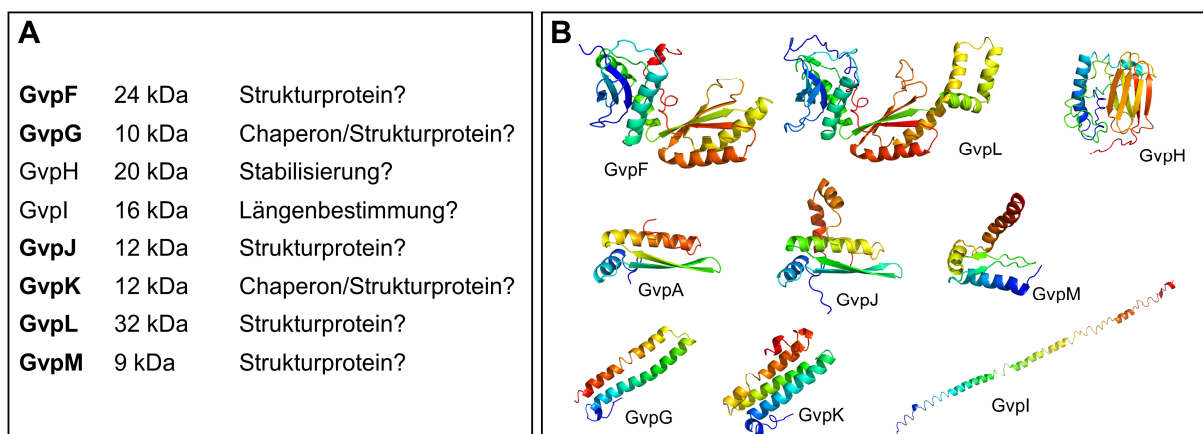


Abbildung 4: Mögliche Struktur und Funktion der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF bis GvpM. **A** Tabellarische Aufstellung der akzessorischen Gasvesikelproteine und deren vermutete Funktion bei der Gasvesikelbildung. In fett dargestellt sind die Gasvesikelproteine, die essentiell für die Bildung eines gasgefüllten Vesikels sind. **B** Dreidimensionale Strukturvorhersagen der akzessorischen Gasvesikelproteine errechnet durch den I-Tasser Server (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Zusätzlich ist das *in silico* Modell von GvpA (Strunk *et al.*, 2011) angegeben, da dieses als Grundlage für die Strukturvorhersage von GvpJ und GvpM diente. Der N-terminale Bereich der Proteine ist in blau und der C-terminale Bereich ist in rot dargestellt.

Die mRNA der *gvpFGHIJKLM*-Gengruppe wird bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase synthetisiert (Offner and Pfeifer, 1995). Daher liegt die Vermutung nahe, dass einige oder all diese Proteine in frühen Schritten oder sogar bei der Initiation der Gasvesikelbildung beteiligt

sind. So könnte die Gasvesikelbildung mit der Aggregation einiger oder aller akzessorischer Gasvesikelproteine beginnen, an die GvpA adhärert und schließlich die bikonischen, gasgefüllten Strukturen ausbildet, welche bereits im frühen Wachstumsstadium mittels TEM erkennbar sind. Der weitere Einbau von GvpA resultiert schließlich in den typischen spindel- und zylinderförmigen Gasvesikeln (Pfeifer *et al.*, 1997). Zudem konnten die meisten akzessorischen Gasvesikelproteine (ausgenommen GvpK) in immunologischen und massenspektrometrischen Analysen in Gasvesikelpräparationen in geringen Mengen nachgewiesen werden (Halladay *et al.*, 1993; Shukla and DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Dies ist ein Indiz dafür, dass, neben GvpA und GvpC, die meisten akzessorischen Gasvesikelproteine Strukturproteine oder an der Gasvesikelhülle assoziiert sind. Es ist aber unklar, ob diese wirklich ein Teil der Gasvesikelhülle sind oder ob sie mit der Oberfläche der Hülle bzw. bei der Bildung der Gasvesikel interagieren.

Weitere Studien ergaben, dass die relative Menge einiger akzessorischer Gasvesikelproteine zueinander eine bedeutende Rolle für die Gasvesikelbildung spielt (Tavlaridou *et al.*, 2013). So führt die Überexpression von *gvpH*, *gvpG* und *gvpM* in Anwesenheit der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 zu einem Vac-negativen Phänotypen in p-vac+pX^{ex}-Transformanten. Die Überexpression von *gvpF*, *gvpI*, *gvpJ*, *gvpK* und *gvpL* hat dagegen keine Auswirkung. Der negative Effekt großer Mengen GvpM auf die Gasvesikelbildung kann jedoch durch die Anwesenheit vergleichbarer Mengen GvpH, GvpJ und GvpL in p-vac+pXM^{ex}-Transformanten kompensiert werden (Tavlaridou *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurde in *in vitro* Interaktionsstudien mittels Affinitätschromatographie eine Interaktion von GvpM mit GvpH, GvpL oder GvpJ, aber nicht mit GvpG, festgestellt (Tavlaridou *et al.*, 2014). GvpM ist ein stark hydrophobes Protein, dass dazu neigt unspezifisch Proteinaggregate zu bilden. Dieses Verhalten konnte in *in vivo* Analysen mit GFP-fusioniertem GvpM (M_{GFP}) nachgewiesen werden, da M_{GFP}-Transformanten einzelne fluoreszierende Foci zeigten (Tavlaridou *et al.*, 2014). Die Fluoreszenz in L_{GFP}- bzw. H_{GFP}-Transformanten hingegen war diffus verteilt. Die durch Aggregation von M_{GFP} verursachten Foci können durch die Anwesenheit von GvpH in HM_{GFP}- bzw. H_{GFP}M-Transformanten aufgelöst werden. In LM_{GFP}- bzw. L_{GFP}M-Transformanten hingegen sind weiterhin Foci sichtbar. Somit ist GvpH in der Lage, GvpM-Aggregate zu verhindern und hält GvpM „in Lösung“ (Tavlaridou *et al.*, 2014).

3.7. Die Cellulose-Bindedomäne als Fusionstag zur Proteinisolation

Über 100 verschiedene Cellulose-Bindedomänen (CBD) wurden in über 40 verschiedenen Spezies identifiziert, welche zwischen 33 und über 170 Aminosäuren lang sind. Diese CBDs können aufgrund ihrer Aminosäuresequenzähnlichkeit in vierzehn unterschiedliche Familien (I-XIV) eingeordnet werden (Tomme *et al.*, 1996a; Tomme *et al.*, 1996b; Levy and Shoseyov, 2002). Die drei Hauptfamilien sind jedoch die Familien I bis III (Linder and Teeri, 1997). Die CBDs sind in der Regel Bestandteile von Cellulasen, die Cellulose in einfache Glucose hydrolytisch spalten und so für den Organismus zugänglich machen. Die CBD übernimmt dabei die Aufgabe der Bindung an die Cellulose. Auch das anaerobe und thermophile Bakterium *Clostridium (C.) thermocellum* besitzt die Eigenschaft Cellulose

hydrolytisch zu spalten (McBee, 1954). Dazu sekretiert es verschiedenste Cellulasen, die an der Zelloberfläche das sogenannte Cellulosom bilden. Die S1 *subunit*, die einen nicht-katalytischen Teil des Cellulosoms bildet, wird durch den *cipB*-Leserahmen kodiert, welches die Cellulose-Bindedomäne enthält. Die CBD des CipB-Proteins aus *C. thermocellum* gehört zu den Familie-III CBDs und besitzt innerhalb des Cellulosoms die Aufgabe der Bindung an kristalline und amorphe Cellulose, wodurch katalytische Enzyme diese abbauen können (Poole *et al.*, 1992; Morag *et al.*, 1995). Zusätzlich bindet die CBD ein Ca^{2+} -Ion, das vermutlich an der Stabilisierung des Proteins beteiligt ist (Tormo *et al.*, 1996). Durch die hohe Spezifität und starke Bindung an mikrokristalliner Cellulose, die nur durch starke Detergenzien oder Lösemittel gelöst werden kann, zählt diese zu den „*high affinity*“ CBDs (Morag *et al.*, 1995; Tomme *et al.*, 1996a). Die CBD kann in molekularbiologischen Untersuchungen halophiler Proteine als Affinitätstag verwendet werden, da dieser sich als halotolerant erwiesen hat (Ortenberg and Mevarech, 2000; Irihimovitch and Eichler, 2003; Schlesner *et al.*, 2012).

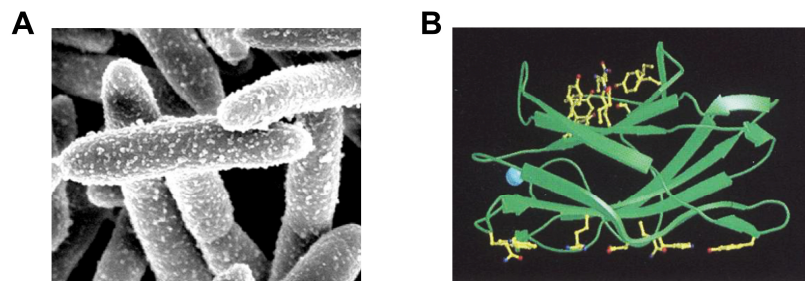


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahme von *Clostridium thermocellum* und dreidimensionale Struktur der Cellulose-Bindedomäne. **A** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *C. thermocellum* Zellen mit sekretierten Polycellulosomen an der Zelloberfläche (Hong *et al.*, 2014). **B** Kristallstruktur der CBD des CipB Proteins aus *C. thermocellum* (Tormo *et al.*, 1996). Das Ca^{2+} -Ion ist blau dargestellt. Die Aminosäuren, die den Zell/Substrat-Kontakt vermitteln, sind im unteren Bereich des Proteins gelb dargestellt.

3.8. split-GFP als Reporter für Protein-Protein Interaktionen

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) findet bereits seit einigen Jahrzehnten Anwendung in der Erforschung zahlreicher biologischer Prozesse. So wird dieses vor allem in der Zellbiologie zur Fusionierung von Proteinen verwendet, um deren räumliche oder auch zeitliche Verteilung in Zellen, Geweben und Organismen zu lokalisieren (Gerdes and Kaether, 1996; Ludin and Matus, 1998; Chudakov *et al.*, 2005; Algubory and Houdebine, 2006; Hoffman, 2015). Zudem kann das *gfp*-Gen als Reporter für Genexpressionsstudien verwendet werden (Chalfie *et al.*, 1994; Stretton *et al.*, 1998; Soboleski, 2004; Born and Pfeifer, 2019). Ursprünglich wurde es aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura *et al.*, 1962) und besteht aus 238 Aminosäuren, die eine *barrel*-Struktur mit 11 β -Faltblättern ausbilden (Prasher *et al.*, 1992). Das Chromophor des GFPs wird in einem autokatalytischen Prozess aus den Aminosäuren Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ und Gly⁶⁷ gebildet. Je nach Ausrichtung des Tyr⁶⁶ besitzt das GFP zwei Absorptionsmaxima (395 nm und 470 nm), aber nur ein Emissionsmaximum von 509 nm. Heutzutage finden unzählige GFP-Varianten Anwendung. Durch

Modifikationen in der Aminosäuresequenz kann bspw. das Fluoreszenzspektrum in ein anderes Farbspektrum verschoben (Nagai *et al.*, 2002; Subach *et al.*, 2008) oder die Fluoreszenz gesteigert werden (Cinelli *et al.*, 2000; Reuter and Maupin-Furlow, 2004; Born and Pfeifer, 2019).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist das Fragmentieren des GFPs (Abbildung 6). Erstmals wurde die split-GFP Methode mit antiparallelen Leucin-Zippeln sowohl *in vitro* als auch in *E. coli* untersucht (Ghosh *et al.*, 2000; Magliery *et al.*, 2004). GFP wurde zwischen den Aminosäureresten 157 und 158 geteilt und die antiparallelen Leucin-Zipper mit den resultierenden GFP-Fragmenten (NGFP und CGFP) fusioniert. Durch die Interaktion der Leucin-Zipper ist das split-GFP in der Lage zu einem funktionalen Protein zu assemblieren. Dieser Zustand erwies sich als irreversibel und somit auch geeignet für den Nachweis von schwachen Interaktionen. Eine Reassemblierung des split-GFPs ohne vermittelte Leucin-Zipper Interaktion ist nicht möglich (Magliery *et al.*, 2004). Ähnliche Ergebnisse konnten mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) und cyan fluoreszierenden Protein (CFP) in mammalischen Zelllinien erzielt werden (Hu *et al.*, 2002). Auch die gleichzeitige Beobachtung mehrerer Protein-Protein Interaktionen war unter Verwendung von YFP- und CFP-Fusionspaaren möglich (Hu and Kerppola, 2003). In zusätzlichen Studien wurde die split-GFP Methode weiterentwickelt. So ist bspw. ein durch Licht aktivierbares split-GFP, das zur Induktion von Protein-Protein Interaktionen verwendet werden kann (Kent, 2011) sowie ein effizienteres split-superpositiv GFP, das schneller assemblieren kann, verfügbar (Blakeley *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde 2013 erstmals das *tripartite* GFP angewandt, das aus den drei Fragmenten (GFP1-9, GFP10 und GFP11) besteht (Cabantous *et al.*, 2013). Die zu untersuchenden Proteine werden jeweils mit den Fragmenten GFP10 und GFP11 fusioniert, welche nur aus dem β -Faltblatt 10 (GFP10) bzw. dem β -Faltblatt 11 (GFP11) bestehen. Somit sind die zu fusionierenden Fragmente deutlich kleiner als das N- bzw. CGFP, wodurch es zu deutlich weniger sterischen Hindernissen kommt. Durch die Komplementation mit dem Fragment GFP1-9 kann das GFP assemblieren und die Interaktion mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden. Mit Hilfe des *tripartite* GFPs konnten Interaktionen sowohl in Bakterien, als auch in Hefen, Pflanzen und Mammalia nachgewiesen werden (Cabantous *et al.*, 2013; Finnigan *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). In Archaea, speziell in Haloarchaea, wurde die für Nidrigsalz-adaptierte Organismen entwickelte split-GFP Methode bislang nicht angewandt (Winter *et al.*, 2018).

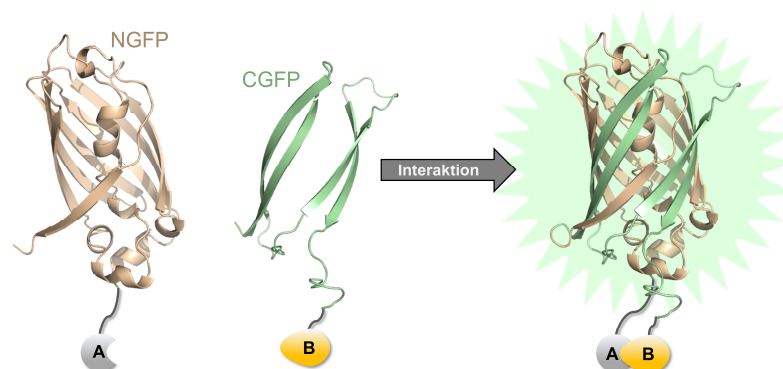


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Grundprinzips der split-GFP Methode. Das GFP wird in NGFP (beige) und CGFP (grün) gespalten und jeweils an das zu untersuchende Protein A bzw. B fusioniert. Im Falle einer Interaktion von Protein A und Protein B assemblieren die GFP-Fragmente zu einem funktionalen GFP.

3.9. Ziel der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war die Entschlüsselung des Protein-Protein Interaktionsnetzwerkes der akzessorischen Gasvesikelproteine, um die Rolle dieser Proteine bei der Gasvesikelbildung besser verstehen zu können.

Zunächst sollte ein System etabliert werden, das es ermöglicht, *in vivo* Protein-Protein Interaktionen in *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten zu identifizieren und zu quantifizieren. Mit Hilfe dieses Systems sollten die in früheren Arbeiten identifizierten Interaktionen verifiziert und vervollständigt werden. Um die anfänglichen Prozesse der Gasvesikelassemblierung besser verstehen zu können, sollte das Hauptstrukturprotein GvpA in die Interaktionsstudien mit einbezogen werden. Darüber hinaus war der Einfluss der Anwesenheit von GvpH auf die Interaktion von GvpM mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen von Interesse, da dieses in vergangenen Studien bereits einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von GvpM zeigte.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten mögliche Interaktionsstellen innerhalb von GvpM zu den akzessorischen Gasvesikelproteinen über eine Fragmentierung des Proteins eingegrenzt werden. Darüber hinaus sollte die Interaktion von GvpM und GvpL näher beleuchtet werden. Mittels GvpM-Varianten mit Punktmutationen könnten Aminosäuren identifiziert werden, die eine Rolle bei der L/M-Interaktion spielen. Diese Varianten sollten auch in $\Delta M + M_{mut}$ -Transformanten auf Gasvesikelbildung untersucht werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien und Hilfsmittel

Chemikalien	Hersteller
Agarose Biozym ME	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumperoxisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	LS Labor Service GmbH, Griesheim
Cellulose Avicel PH-101	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
dNTPs	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglycol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Histidin HCl	Serva, Heidelberg
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Applichem, Darmstadt
Mangan(II)-Chlorid ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol (MeOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mevinolin	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	LS Labor Service GmbH, Griesheim
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN GmbH, Hilden
Novobiocin	Serva, Heidelberg
Odyssey-Blocking-Buffer	Licor Bioscience, Nebraska, USA
Orange G	Merck KGaA, Darmstadt
Ortho-Phosphorsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka Biochemika
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rinderserum Albumin (BSA)	Böhringer, Mannheim
Roti®-Blue	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Fluoro PVDF-Membran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 1 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (AA/BA 37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Applichem, Darmstadt
Tricine	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
ε-Aminocaprinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Nicht aufgeführte Chemikalien und Hilfsmittel stammen von den Firmen Applichem, Boehringer Ingelheim, Merck, Sigma, LS Labors, Roche Diagnostics, Carl Roth und Serva.

4.1.2. Enzyme und Kits

rSAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)	NEB GmbH, Frankfurt am Main
DNaseI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DreamTaq DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB GmbH, Frankfurt am Main
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	NEB GmbH, Frankfurt am Main
T4-DNA-Ligase	NEB GmbH, Frankfurt am Main
T4 DNA Polymerase	NEB GmbH, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen	NEB GmbH, Frankfurt am Main
E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA
GeneElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

4.1.3. Größenstandards

DNA

GeneRuler™ DNA Ladder Mix # SM 0331

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Protein

EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder

Fisher BioReagents, Schwerte

Unstained Protein MW Marker # 26610

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten synthetischen Oligonukleotide sind in Tabelle 7 im Anhang aufgeführt.

4.1.5. Verwendete Mikroorganismen

Haloferax volcanii WR340

(Bitan-Banin *et al.*, 2003)

Escherichia coli TOP10

Invitrogen, USA

Escherichia coli GM1674 (dam⁻)

(Palmer and Marinus, 1994)

Escherichia coli BL21 codon+

Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt

4.1.6. Verwendete Plasmidvektoren

pJAS35 (Ampicillin^R, Novobiocin^R)

(Pfeifer *et al.*, 1994)

pWL102 (Ampicillin^R, Mevinolin^R)

(Lam and Doolittle, 1989)

pET28a(+) (Kanamycin^R)

Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt

pCBD (Ampicillin^R, Mevinolin^R)

Diese Arbeit

pJAS-NGFP-Nterm (Ampicillin^R, Novobiocin^R)

(Winter *et al.*, 2018)

pJAS-NGFP-Cterm (Ampicillin^R, Novobiocin^R)

(Winter *et al.*, 2018)

pWL-CGFP-Nterm (Ampicillin^R, Mevinolin^R)

(Winter *et al.*, 2018)

pWL-CGFP-Cterm (Ampicillin^R, Mevinolin^R)

(Winter *et al.*, 2018)

pP2-NGFP-Nterm (Ampicillin^R, Novobiocin^R)

Alisa Jost, unveröffentlicht

pP2-NGFP-Cterm (Ampicillin^R, Novobiocin^R)

Alisa Jost, unveröffentlicht

4.2. Mikrobiologische Methoden

4.2.1. Kultivierung der Mikroorganismen

Escherichia coli

Die verschiedenen *E. coli* Stämme (TOP10 / *dam*⁻ / BL21 codon+) wurden aerob über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in LB-Medium kultiviert. Zur Selektion von Transformanten wurden dem Medium entsprechend dem beinhaltenen Antibiotika-Resistenzgen 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin supplementiert. Zur Kultivierung auf Festmedium wurden dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugefügt und ebenfalls über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Verwendetes Nährmedium:

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl; pH 7,2

Haloferax volcanii

Die Kultivierung von *Haloferax volcanii* WR340 erfolgte in 3 M Vollmedium + Histidin (VMH). Zur Selektion von Transformanten mit Mevinolin- und/oder Novobiocin-Resistenz wurde dem Medium Antibiotikum in den Endkonzentrationen 0,2 µg/ml (Novobiocin) oder 6 µg/ml (Mevinolin) beigelegt. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte aerob bei 37 °C oder 42 °C und 180 rpm für zwei bis fünf Tage. Für Fluoreszenzmessungen erfolgte die Anzucht für einen Tag bei 37 °C und 180 rpm mit einer darauffolgenden Inkubation über Nacht bei 30 °C und 180 rpm. Zur Kultivierung auf Festmedium wurden dem Medium 1,8 % (w/v) Agar hinzugefügt und für zwei bis sieben Tagen bei 42 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert.

Verwendetes Nährmedium:

3 M VMH: 3M NaCl; 150 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 50 mM KCl; 3 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 10 nM MnCl₂; 0,5 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,3 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt; 0,02 % (w/v) Histidin; 25 mM Tris-HCl; pH 7,2

4.2.2. Transformation von *E. coli*

Die chemisch-kompetenten *E. coli* wurden mittels der Hitzeschock-Methode nach Sambrook and Russell (2001) transformiert. Der Stamm *E. coli* Top10 wurde dazu verwendet, um Plasmid-DNA nach Klonierungen, für Sequenzierungen und für Restriktionsanalysen zu vermehren. Die TOP10-transformierten Plasmide wurden dazu verwendet *E. coli dam*⁻ zu transformieren, welcher Plasmid-DNA ohne *dam*-Methylierung amplifiziert. Dies verbessert die Transformation von *Hfx. volcanii* WR340. Der

Stamm BL21 codon+ wurde für die heterologe Synthese der GvpX_{His}-Fusionsproteine verwendet. Die Selektion und Kultivierung der Transformanten erfolgten wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben.

4.2.3. Transformation von *Haloferax volcanii*

Die Transformation von *Haloferax volcanii* WR340 erfolgte wie von Pfeifer and Ghahraman (1993) beschrieben. Um die halobakterielle Restriktionsbarriere von *Hfx. volcanii* WR340, die fremdmethylierte DNA hydrolysiert, zu umgehen, wurden die in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen demethylierten Plasmide verwendet. Für die Transformation wurden 5 ml 3 M VMH mit *Haloferax volcanii* WR340 inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0,2 bis 0,7) wurden 2 ml dieser Übernachtskultur bei 9600 x g für 2 min sedimentiert und das Sediment in 100 µl 1 M Sphäroblastierungslösung (SPH)-Lösung (15 % (w/v) Saccharose; 1 M NaCl; 27 mM KCl; 50 mM Tris; pH 8,75) resuspendiert. Daraufhin wurden 10 µl einer 1 M SPHE-Lösung (100 % (v/v) SPH-Lösung; 0,5 M EDTA; pH 8,75) hinzugefügt und 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Je 22 µl der Zellsuspension wurden mit 1 µl der jeweiligen Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurden dem Ansatz 23 µl einer 60 %igen PEG600-Lösung (60 % (v/v) PEG600; 40 % (v/v) SPH-Lösung) hinzugefügt und unter vorsichtigem Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Die Suspension wurde für 20 min bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend mit 950 µl 3 M VMH + 15 % (w/v) Saccharose versetzt. Die Regeneration der Zellen erfolgte für 2-3 h stehend bei 42 °C. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 min bei 9600 x g sedimentiert, 900 µl des Überstandes verworfen und das Sediment in den verbleibenden 100 µl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Selektivmedium (Novobiocin bei Transformanten mit pJAS35, Mevinolin bei Transformanten mit pWL102 und beide Antibiotika bei Transformanten mit beiden Plasmiden) ausplattiert und für 3-10 Tage bei 42 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert, bis ein Wachstum in Form von Kolonien festzustellen war. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Inkubation bei Zimmertemperatur weitergeführt.

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) wurde verwendet, um gezielt DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit zum Einfügen spezifischer Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen verwendet. Dazu wurden die in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten synthetischen Oligonukleotide verwendet, die als Überhangsequenz die jeweilige Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease enthalten. Die erzeugten Amplifikate konnten schließlich zu Klonierungszwecken verwendet werden (Abschnitt 4.3.3).

Mittels Mutagenese-PCR wurden ortsspezifisch Mutationen (Punktmutationen oder Deletionen) in die *gvp*-Leserahmen eingefügt. Dazu wurden die in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten synthetischen Oligonukleotide verwendet, welche auf der Matrize *back-to-back* lokalisiert binden und das vollständige Plasmid mit den gewünschten Mutationen amplifizieren.

Mit Hilfe von Kolonie-PCRs wurde überprüft, ob die Transformanten die gewünschten Plasmide korrekt aufgenommen haben. Dazu wurden einzelne Kolonien von *E. coli* in 25 µl des PCR-Ansatzes inokuliert. Dabei dienen die Zellen als Matrize. Bei der Überprüfung von *Hfx. volcanii*-Transformanten wurden Flüssigkulturen 1:50 mit ddH₂O verdünnt und 2 µl der Verdünnung in die PCR eingesetzt.

Für die Amplifikation der DNA wurde entweder die DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific™; Kolonie-PCR der *E. coli*-Transformanten) oder die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) eingesetzt. Im Gegensatz zur DreamTaq DNA Polymerase besitzt die Q5 eine extrem niedrige Fehlerrate und ist auch in der Lage, sehr lange DNA-Fragmente zu amplifizieren.

Zusammensetzung des PCR- Ansatzes unter Verwendung der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)

DNA-Matrize	2 ng
5X Q5 Reaction Buffer	1/5 vol
5X Q5 High GC Enhancer	1/5 vol
dNTP-Mix (2mM)	0,2 mM
Oligonukleotide	je 0,5 µM
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	0,02 U/µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Temperaturprofil unter Verwendung der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase

Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	30x
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Annealing	T _m + 1 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	20 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Pause	4 °C	∞	

Zusammensetzung des PCR- Ansatzes unter Verwendung der Dreamtaq DNA Polymerase (Thermo Scientific™)

DreamTaq Buffer	1/10 vol
dNTP-Mix (2mM)	0,2 mM
Oligonukleotide	je 0,25 µM
DreamTaq DNA-Polymerase	1,25 U
ddH ₂ O	ad 20 µl

Temperaturprofil unter Verwendung der Dreamtaq DNA Polymerase (Thermo Scientific™)

Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	30x
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	$T_m - 5\text{ °C}$	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Pause	4 °C	∞	

Nach erfolgter PCR wurde der Ansatz bei DNA-Fragmenten bis 3 kb mit dem GeneElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma Aldrich) und bei DNA-Fragmenten >3 kb mit dem DNA Clean & Concentrator™-5 Kit (Zymo Research) gereinigt. Es wurde jeweils nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.3.2. Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide

Zur Generierung von kurzen doppelsträngigen DNA-Fragmenten (<120 bp) wurden jeweils 10 µl komplementäre Oligonukleotide (10 µM) 1:1 gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend für eine Stunde bei Zimmertemperatur abgekühlt. Durch die Hybridisierung der Oligonukleotide wurden Überhänge generiert, die passgenau zu den durch Restriktionsendonukleasen entstandenen Überhänge im Zielvektor sind. Damit das hybridisierte DNA-Fragment in den Zielvektor ligiert werden konnte, mussten die Enden mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK, NEB) phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung erfolgte nach Herstellerangaben.

4.3.3. Molekularbiologische Standardtechniken

Restriktionshydrolyse

Die Hydrolyse erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen spalten (siehe Abschnitt 4.1.2). Die hydrolytische Spaltung wurde eingesetzt, um Plasmide zu überprüfen oder für Klonierungszwecke. Dazu wurden jeweils 1-2,5 µg Plasmid-DNA oder 250-500 ng eines PCR-Ansatzes nach Herstellerangaben gespalten

Agarose-Gelelektrophorese

Die hydrolytisch gespaltenen DNA-Fragmente wurden auf einem 1 %igen TAE-Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Zur Größenabschätzung der einzelnen DNA-Fragmente wurde ein Größenstandard (Abschnitt 4.1.3) mitgeführt. Zur Visualisierung der DNA wurde das Agarosegel für etwa 10 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) inkubiert und mit UV-Licht angeregt.

50x TAE:	2 M Tris; 50 mM EDTA; pH 8,5 (mit Essigsäure)
Gelpuffer:	1x TAE
Laufpuffer:	0,5x TAE
10x DNA-Auftragspuffer:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Orange G; 50 % (v/v) Glycerin; 50 mM EDTA; pH 8,0

Gelextraktion

Um bestimmte DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu erhalten, wurde das jeweilige Fragment mit einem Skalpell aus einem 1 % TAE-Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die extrahierte DNA wurde für Ligationen verwendet.

Ligation

Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) mittels der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs). Zuvor wurde die lineare Insert-DNA mittels T4 Polynukleotidkinase (New England Biolabs) phosphoryliert und die Vektor-DNA mittels rSAP (*shrimp alkaline phosphatase*, New England Biolabs) dephosphoryliert. Dies erfolgte jeweils nach Angaben des Herstellers. Zur Zirkularisierung der Plasmid-DNA nach einer Mutagenese-PCR wurde der PCR-Ansatz mittels des DNA Clean & Concentrator™-5 Kits (Zymo Research) aufgereinigt und das gereinigte Produkt mit der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) für eine Stunde bei Raumtemperatur ligiert. Im Anschluss wurde *E. coli* TOP10 mit 10 µl des jeweiligen Ligationsansatzes transformiert. Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte mittels E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Biotek) und die isolierten Plasmide wurden zur Überprüfung an den Sequenzierservice von Eurofins Genomics gesendet.

4.4. Proteinchemische Methoden

4.4.1. Herstellung halobakterieller Zellextrakte von hydrophoben Gasvesikelproteinen

Zum spezifischen Nachweis hydrophober Gasvesikelproteine mittels Western-Analysen, wurden halobakterielle zellfreie Extrakte von *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten hergestellt. Dazu wurden 50 ml spät-exponentieller Zellen (OD₆₀₀ von 1,5 bis 2,0) bei 2370 x g für 20 min und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde anschließend in 2 ml TE-Puffer pH 8,0 + Dnase I (1 µg/ml) resuspendiert und in einen Dialyseschlauch (6-8 kDa Spectrum Laboratories) überführt. Zur Unterstützung des Zellaufschlusses und zur Entfernung von störenden Salzen und Detergenzien, wurden die Zellsuspensionen gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,2 für mindestens 2 h bei Raumtemperatur dialysiert. Die löslichen Zellbestandteile der Zelllysate wurden anschließend von den unlöslichen Bestandteilen und Zelltrümmern mittels Zentrifugation (16.200 x g, 20 min, 4 °C) getrennt. Die lösliche Proteinfraction

wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und das unlösliche Sediment mit 500 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,2 resuspendiert. Die resultierende lösliche Fraktion (Fraktion 1) und Membranfraktion (Fraktion 2) wurden erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand aus Fraktion 1 wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand aus Fraktion 2 wurde verworfen und das Sediment in 500 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,2 aufgenommen und mit dem Sediment aus Fraktion 1 vereinigt. Daraufhin erfolgten insgesamt fünf weitere Zentrifugationsschritte, wobei die verschiedenen Fraktionen nach jedem Schritt vereinigt wurden. Im letzten Zentrifugationsschritt wurde Fraktion 2 in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 aufgenommen. Anschließend wurde der Proteingehalt der Fraktionen mittels Bradford-Test bestimmt und für Western-Analysen eingesetzt.

4.4.2. Herstellung halobakterieller Zellextrakte für *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien

Für *in vitro* Interaktionsstudien wurden *Haloferax volcanii* WR340-Transformanten in 3 M VMH und 0,2 µg/ml Novobiocin bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5 bis 1,8 wurden 50 ml der Zellen für 20 min bei 12210 x g und 4 °C sedimentiert und das Sediment in 5 ml Lysepuffer (2,5 M KCl; 50 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) + DnaseI (0,1 mg/ml) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über Ultraschall mit einer Mikrospritze auf Eis (Branson Sonifier 250; Duty Cycle: 55 %; Output Control: 5; 2 min). Zelltrümmer und Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 2370 x g und 4 °C von der löslichen Proteinfraction abgetrennt. Der Proteingehalt der löslichen Proteinfraction wurde mittels Bradford-Test bestimmt und das Zellysate für *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels 6x-Histidin-tag (Abschnitt 4.4.10) eingesetzt.

4.4.3. Herstellung von Gesamtzellysate für native Affinitätschromatografie

Für die Herstellung von Gesamtzellysate für Proteinreinigungen oder Pulldown-Assays via CBD-fusionierten Gasvesikelpoteinen wurden 400 ml 3 M VMH mit entsprechender Antibiotika-supplementation inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm aerob bis zur spät exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} 1,5-2) inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min und 12210 x g für 20 min und 4 °C sedimentiert und das Sediment in 5 ml Lysepuffer (2,5 M KCl; 50 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) + DnaseI (0,1 mg/ml) resuspendiert. Zur Reduktion der Viskosität durch große Mengen DNA erfolgte eine Inkubation für ca. 30 min bei 37 °C, bis eine homogene Suspension vorliegt. Anschließend wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier 250; Duty Cycle: 55 %; Output Control: 5; 2 min) und das Lysat bei 2370 x g für 20 min und 4 °C zentrifugiert. Die lösliche Proteinfraction wurde für Pulldown-Assays verwendet. Für die Reinigung von CBDGvp-Fusionsproteinen wurde die lösliche Proteinfraction erneut mittels

Ultrazentrifugation mit 100000 x g und 4 °C für 1 h sedimentiert. Die lösliche Proteinfraction aus der Ultrazentrifugation wurde für die Proteinreinigung verwendet.

4.4.4. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt eines Zelllysates oder gereinigter Proteinfraction wurde photometrisch mit Hilfe des Bradford-Tests (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurden 20 µl der jeweiligen Proteinlösung mit 980 µl Bradford-Reagenz (0,01 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 4,75 % (v/v) Ethanol; 8,50 % (v/v) 85 %ige Ortho-Phosphorsäure) versetzt, für 5 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) in bekannten Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg/ml) konnte der Proteingehalt ermittelt werden.

4.4.5. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger

Die elektrophoretische Auftrennung verschiedener Proteinfractionen erfolgte mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schagger (Schagger and von Jagow, 1987). Dazu wurden 10-20 µg eines Gesamtzelllysates oder 15 µl der Wasch- bzw. Elutionsfractionen aus Protein-Protein-Interaktionsstudien mit 3x SDS-Auftragspuffer (125 mM Tris; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,5 % (v/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde ein Proteinmarker (EZ-Run Prestained Rec Protein Ladder, Fisher BioReagents; Unstained Protein MW Marker, Fermentas) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte ca. 1,5 h mit 120 V.

Stocklösungen	Trenngel 12 %	Sammelgel 4 %
Rotiphorese® Gel 30 (AA/BA 37,5:1)	10,8 ml	2 ml
3x Schagger-Gelpuffer (3 M Tris; 0,3 % (w/v) SDS; pH 8,45)	9 ml	3,5 ml
25 % (v/v) Glycerin	7,2 ml	/
ddH ₂ O	/	9 ml
10 % (w/v) APS	200 µl	200 µl
TEMED	40 µl	40 µl

Verwendete Stocklösungen

10x Anodenpuffer: 2 M Tris; pH 8,9

10x Kathodenpuffer: 1 M Tris; 1 M Tricine; 1 % (w/v) SDS; pH 8,25

4.4.6. Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Die Visualisierung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte mittels kolloidalem Coomassie. Dazu wurden 60 ml dH₂O mit 20 ml Methanol vermischt und unter Rühren 20 ml 5-fach konzentrierter Roti®-Blue Lösung (Carl Roth) hinzugefügt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit ca. 100 ml der einfach konzentrierten Färbelösung über Nacht bei RT schwenkend inkubiert. Das Entfernen der Hintergrundfärbung erfolgte durch Inkubation mit dH₂O.

4.4.7. Antikörperherstellung aus synthetischen Peptiden

In dieser Arbeit wurden Antiseren zur Detektion von GvpF, GvpI und GvpL hergestellt. Jeweils ein Kaninchen wurde mit den unten aufgeführten synthetischen Peptiden immunisiert (Eurogentec). Die Immunisierung erfolgte jeweils für ca. 28 Tage (Protokoll: AS-SMAF-SINGLE), wobei nach 0 (*pre-immune bleed*), 21 (*medium bleed*) und 28 Tagen (*final bleed*) Antiseren entnommen wurden. Zusätzlich wurde das *final bleed* Antiserum gereinigt und die gereinigten Antikörper in Western-Analysen eingesetzt. Die Herstellung der synthetischen Peptide, der Antiseren und die Aufreinigung des *final bleed* erfolgte durch die Firma Eurogentec Deutschland GmbH.

synthetische Peptide:

GvpF: nh₂- C+DIDTTDPERTDEDVE –conh₂

GvpI: nh₂- C+WTRNRKQSEPRRDDS –conh₂

GvpL: nh₂- C+RWLEDHYEGFRDELA –conh₂

4.4.8. Nachweis von Proteinen mittels *semi-dry* Western-Analysen

Zur Detektion von Gasvesikelproteinen aus Gesamtzelllysaten oder Proteinfractionen wurden Western-Analysen durchgeführt. Dazu wurden 10-20 µg eines Gesamtzelllysates oder 15 µl einer Proteinfraction mittels SDS-PAGE elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran (Roti®-Fluoro PVDF, Carl Roth) transferiert. Der Transfer erfolgte mittels PerfectBlue™ Semi-Dry Elektrobloetter (PeqLab) mit dem unten aufgeführten Aufbau. Die Übertragung erfolgte nach der *semi-dry* Methode für 30 min bei 2 mA/cm² Gel.

Kathode

3x Filterpapier	einggelegt in Kathodenpuffer
SDS-Gel	30 min in Kathodenpuffer äquilibriert
PVDF-Membran	3 min in MeOH, kurz in dH ₂ O geschwenkt, 10 min in Anodenpuffer 2
2x Filterpapier	einggelegt in Anodenpuffer 2
1x Filterpapier	einggelegt in Anodenpuffer 1

Anode

Pufferzusammensetzungen:

Kathodenpuffer:	40 mM ϵ -Aminocapronsäure; 0,05 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer 1:	0,3 M Tris; 10 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2:	25 mM Tris; 10 % (v/v) Methanol
10x PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4

Nach dem Transfer wurde die Membran für ca. 1 h bei Zimmertemperatur getrocknet. Danach wurde diese mit 100 % (v/v) Methanol reaktiviert, 2 min in 1x PBS gewaschen und für min 1 h bei Zimmertemperatur mit 1x PBS verdünntem (1:1) Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit den jeweiligen Gvp-Antiseren über Nacht bei RT inkubiert. Nach erfolgtem Blockieren wurde die Membran viermal für 5 min mit ca. 20 ml Waschpuffer (1x PBS; 0,1 % (v/v) Tween® 20) bei RT gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (IRDye 800CW, LI-COR) erfolgte für 1 h bei RT. Im Anschluss folgten erneut vier Waschschriffe. Zur Beendigung des Western wurde die Membran vollständig getrocknet und dunkel gelagert. Die Detektion des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers erfolgte im Nah-Infrarotbereich (800 nm) mit einem Odyssey Fc Imager (LI-COR).

Tabelle 1: In den Western Analysen eingesetzte Antikörper und Antiseren.

Antiserum/Antikörper	Detektion von	Produziert in	Verdünnung	Referenz
Anti-pGvpF	GvpF	Kaninchen	1:1000	Diese Arbeit
Anti-pGvpG	GvpG	Kaninchen	1:1000	Offner & Pfeifer, 1995
Anti-pGvpH	GvpH	Kaninchen	1:500	Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004
Anti-pGvpI	GvpI	Kaninchen	1:1000	Diese Arbeit
Anti-pGvpJ	GvpJ	Kaninchen	1:1000	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
Anti-pGvpK	GvpK	Kaninchen	1:1000	Offner & Pfeifer, 1995
Anti-pGvpL	GvpL	Kaninchen	1:500	Diese Arbeit
Anti-pGvpM	GvpM	Kaninchen	1:1000	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
IRDye 800CW	Anti-Kaninchen	Ziege	1:25000	LI-COR Biosciences, Inc.

Puffer zur Herstellung der Antikörperverdünnungen:

- 1. Antikörper:** 1x PBS; 0,2 % (v/v) Tween20
- 2. Antikörper:** 1x PBS; 0,2 % (v/v) Tween20; 0,01 % (w/v) SDS

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der verschiedenen Proteingrößen aller akzessorischer Gasvesikelproteine. Genannt sind die theoretischen Proteingrößen mit und ohne Fusionstag (CBD). Aufgrund der Anpassung an hochmolare Salzkonzentrationen zeigen halophile Proteine ein verändertes Laufverhalten im Gel. Die jeweiligen abweichenden Proteingrößen sind in Klammern dargestellt.

	GvpF	GvpG	GvpH	GvpI	GvpJ	GvpK	GvpL	GvpM	CBD
Ohne CBD in kDa	24 (40)	10 (12)	20 (30)	16 (24)	12 (20)	12 (16)	32 (40)	9 (12)	19 (19)
Mit CBD in kDa	43 (59)	29 (31)	39 (49)	35 (43)	31 (39)	31 (35)	51 (59)	28 (31)	-

4.4.9. Rekombinante Expression und Reinigung von GvpX_{His}-Proteinen aus *E. coli*

Die rekombinante Expression und Reinigung von GvpX_{His}-Proteinen aus *E. coli* erfolgte wie in Zimmermann und Pfeifer (2003) und Tavlaridou *et al.* (2014) beschrieben. Dazu wurde *E. coli* BL21 codon+ mit den jeweiligen pX x pET28a Konstrukten (Anhang Tabelle 8) transformiert. Die Genexpression erfolgte in 100 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin (25 µg/ml) und einer Anfangs-OD_{580nm} von 0,05 aerob bei 37 °C und 180 rpm. Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{580nm} von 0,5) wurde die Genexpression mit 1 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 4 Stunden inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen für 20 min bei 2370 x g und 4 °C sedimentiert und das Sediment in 5 ml Lysepuffer (8 M Harnstoff; 100 mM Na₂HPO₄; 10 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte mittels Ultraschall auf Eis (Branson Sonifier 250; Duty Cycle: 55 %; Output Control: 5; 2 min). Die lösliche Proteinfraction wurde anschließend von den unlöslichen Proteinen und Zelltrümmern durch 20-minütige Zentrifugation mit 2370 x g und 4 °C getrennt und die lösliche Proteinfraction für die Proteinreinigung via Ni-NTA-Agarose verwendet.

Die Proteinreinigung erfolgte im Batch-Verfahren bei 20 °C auf einem Überkoprotierer. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Ni-NTA-Agarose für 3 min bei 2370 x g und 4 °C sedimentiert. Nach dem Äquilibrieren von 2 ml Ni-NTA-Agarose mit 5 ml Lysepuffer wurden 5 ml der löslichen Proteinfraction mit der Ni-NTA-Agarose für 30-60 min inkubiert. Im Anschluss erfolgten vier 10-minütige Waschschrte mit je 5 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff; 100 mM Na₂HPO₄; 10 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 6,0). Zunächst wurden die GvpX_{His}-Proteine für 30 min mit 2 ml Elutionspuffer (8 M Harnstoff; 100 mM Na₂HPO₄; 500 mM Imidazol; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und anschließend zweimal für je 20 min und 1 ml Elutionspuffer eluiert. Zur qualitativen Kontrolle der Proteinreinigung wurde von dem Durchfluss, den letzten beiden Waschfraktionen und allen Elutionsfraktionen eine SDS-PAGE durchgeführt und mittels kolloidalem Coomassie visualisiert (Abschnitt 4.4.6). Da die Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt und die GvpX_{His}-Proteine heterolog synthetisiert wurden, wurden diese mittels schrittweiser Dialyse mit steigender KCl- und sinkender Harnstoffkonzentration in ihre native Konformation rückgefaltet. Die Inkubation in jedem der drei Dialysepuffer erfolgte mindestens für 2 Stunden bei RT. Die Proteinkonzentration der aufgereinigten und rückgefalteten GvpX_{His}-Proteine wurde mittels Bradford-Test bestimmt und für *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien verwendet (Abschnitt 4.4.10).

Dialysepuffer zur Rückfaltung von GvpX_{His}-Proteinen

Puffer 1:	4 M Harnstoff; 0,8 M KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,2
Puffer 2:	2 M Harnstoff; 1,6 M KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,2
Puffer 3:	2,5 M KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,2

4.4.10. Nachweis von *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen über Affinitätschromatographie mit GvpX_{His}-Proteinen und halobakteriellen Lysaten

Die Untersuchung der *in vitro* Protein-Protein Interaktionen unter der Verwendung von GvpX_{His}-Affinitätsmatrices und halobakteriellen Zellextrakten wurde wie von Stella Tavlaridou beschrieben durchgeführt (Tavlaridou *et al.*, 2014). Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten bei 20 °C auf einem Überkopftrotierer mit nachfolgenden Zentrifugationsschritten für 3 min bei 4 °C und 12210 x g. Zur Herstellung der Affinitätsmatrices wurden 200 µl Ni-NTA-Agarose mit 300 µl Dialysepuffer 3 (Abschnitt 4.4.9) äquilibriert und anschließend mit 16-20 nmol der in Abschnitt 4.4.9 hergestellten und rückgefalteten GvpX_{His}-Fusionsproteinen für ca. 1 h inkubiert. Um ungebundene Proteine von der Matrix zu entfernen wurde zweimal für 10 min und 1 ml Waschpuffer 1 (2,5 M KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurde die Matrix mit 2,5 mg halobakteriellem Zellextrakt (Abschnitt 4.4.2) für 30-60 min inkubiert und ungebundene Proteine durch fünfmaliges waschen mit 1 ml Waschpuffer 2 (2,5 M KCl; 10 mM Tris-HCl; 50 mM Imidazol, pH 7,2) für 10 min entfernt, wobei der letzte Waschschrift mit 100 µl Waschpuffer 2 durchgeführt wurde. Die Elution der GvpX_{His}-Proteine erfolgte zweimal mit 100 µl Elutionspuffer (2,5 M KCl; 500 mM Imidazol; 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) für 20 min. Zum Nachweis der Interaktionspartner in den Elutionsfraktionen wurden von der letzten Waschfraktion und den beiden Elutionsfraktionen 15 µl in einer SDS-PAGE eingesetzt und anschließend der putative Interaktionspartner mittels Western-Analysen mit jeweiligen Antisera nachgewiesen.

4.4.11. Pulldown-Assay mittels Cellulose-Bindedomäne-tag

Für native Proteinreinigungen oder *in vivo* Protein-Protein Interaktionsstudien unter der Verwendung der Cellulose-Bindedomäne wurden die in Abschnitt 4.4.3 hergestellten Gesamtzelllysate verwendet. Dazu wurde das gesamte Lysat (ca. 7 ml) mit 1 ml einer 10 %igen (w/v) Cellulosesuspension (Avicel PH-101, Sigma Aldrich) für 30 min bei RT auf einem Überkopftrotierer inkubiert. Im Anschluss wurde die inkubierte Suspension für 30 sec bei 2370 x g und RT zentrifugiert und der Überstand als Durchflussfraktion für spätere Western-Analysen aufbewahrt. Das Cellulosepellet mit gebundenen Proteinen wurde mit 600 µl Waschpuffer (2,5 M KCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert, in eine leere Mobicol-Säule (Mobitec) überführt und bei 1000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert. Anschließend folgten 6 weitere Waschschriffe mit je 600 µl Waschpuffer. Um überschüssige Pufferreste zu entfernen wurde die Säule nach dem letzten Waschschrift leer zentrifugiert. Zur Elution wurde die Cellulose mit 100 % (v/v) Ethylenglycol resuspendiert, 1 min bei RT inkubiert und bei 4700 x g für 5 min zentrifugiert. Zur qualitativen Untersuchung wurden alle Fraktionen über Nacht gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,2

dialysiert. Dies soll gewährleisten, dass für anschließende SDS-PAGEs störende Substanzen, wie das Ethylenglycol oder Salze, aus den Fraktionen entfernt werden. Der Erfolg der Proteinreinigung oder der Pulldown-Assays wurde mittels Coomassie-Färbung (Abschnitt 4.4.6) oder Western-Analysen mit entsprechenden Antiseren (Abschnitt 4.4.8) analysiert.

4.4.12. Protein-Protein Interaktionsstudien mittels split-GFP

Zur Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion der akzessorischen Gasvesikelproteine wurden die Doppeltransformanten, die die jeweiligen Fusionsproteine synthetisieren, in 5 ml VMH mit entsprechender Antibiotikasupplementation inokuliert und für 24 h bei 37 °C und 180 rpm aerob inkubiert, bis die Zellen eine OD_{600nm} von 1 erreichten. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 30 °C für weitere 24 h bis zu einer optischen Dichte von 1,5. Nach erfolgter Inkubation wurden 5 ml der Zellsuspension bei 9600 x g für 2 min bei RT sedimentiert und das Sediment in 1 ml Basalsalz (3 M NaCl; 150 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 5 mM KCl) aufgenommen. Nach erfolgtem Waschschrift wurde die Zellsuspension erneut sedimentiert und in 500 µl Basalsalz aufgenommen. Zur Quantifizierung und Vergleichbarkeit der Fluoreszenzen wurden 300 µl der Zellsuspension in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten (Falcon) mit Basalsalz auf eine OD_{600nm} von 1 gebracht. Die Messung wurde mit dem Fluorescence Image Analyzer FLA-5000 (Fujifilm) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Fujifilm science lab image gauge ver. 4.24*. Die Fluoreszenz ist in *light arbitrary units* (LAU) pro mm² angegeben. Alle Experimente wurden mit zwei biologischen und jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die relative Fluoreszenz (rf) wurde mit der untenstehenden Formel und die p-Werte mit dem Student'schen t-Test berechnet.

$$rf = \frac{\text{Transformante - untransformierter } Hfx. \text{ volcanii WR340}}{\text{untransformierter } Hfx. \text{ volcanii WR340}}$$

4.5. Mikroskopische Analysen

4.5.1. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Um die Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Zellen zu untersuchen, wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop (Leica TCS SP5 II) in Kombination mit der Software *Leica Application Suite* verwendet. Dazu wurden die Transformanten wie in Abschnitt 4.4.12 beschrieben kultiviert und mit 100-facher Vergrößerung mikroskopiert. Die Fluoreszenz wurde mittels einem Argon Laser angeregt. Die Bildverarbeitung erfolgte durch die Software *Fiji*.

4.5.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops konnten einzelne *Hfx. volcanii*-Zellen auf das Vorhandensein von Gasvesikeln untersucht werden. Somit konnten Aussagen getroffen werden, ob durch einzelne Mutationen in der p-vac Region ein veränderter Gasvesikel-Phänotyp vorliegt. Dazu wurden 1-2 Kolonien in 20 µl Basalsalz (3 M NaCl; 150 mM MgSO₄ x 7 H₂O; 5 mM KCl) resuspendiert und die Zellsuspension mit einem Grid (*carbon coated copper grid*, 300 mesh, Plano GmbH) für 2-3 min inkubiert. Anschließend wurde der Grid mit Hilfe eines Whatman-Papiers getrocknet und mit dem Zeiss EM109 betrachtet. Die Visualisierung erfolgte mit der Gatan Multiscan 600CW Kamera.

5. ERGEBNISSE

Über die Bildung und den Aufbau von Gasvesikeln ist bisher nur wenig bekannt. Die gasvesikelkodierende Genregion (p-vac) aus *Hbt. salinarum* PHH1 besteht aus 14 Gasvesikelgenen (*gvp*), die jeweils für ein Gasvesikelprotein kodieren und in zwei entgegengesetzt gerichteten Genclustern orientiert sind: *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM*. Die Gasvesikelhülle besteht hauptsächlich aus GvpA, welches durch Assemblierung einen Monolayer bildet (Strunk *et al.*, 2011). Dieser bildet die charakteristische Rippenstruktur der Gasvesikelhülle und verläuft als *low pitched helix* senkrecht zur Längsachse des Gasvesikels (Offner *et al.*, 1998). Die Gasvesikelhülle wird zusätzlich durch GvpC an der Oberfläche stabilisiert (Hayes *et al.*, 1988; Walsby and Hayes, 1988; Hayes *et al.*, 1992; Englert and Pfeifer, 1993; Offner *et al.*, 1996). Die Proteine GvpD und GvpE sind an der Regulation beteiligt (Offner and Pfeifer, 1995; Hofacker *et al.*, 2004; Scheuch and Pfeifer, 2007; Scheuch *et al.*, 2008). Über die Funktion der acht akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF bis GvpM ist bis heute wenig bekannt. Durch immunologische und massenspektrometrische Analysen wurde vermutet, dass die meisten der akzessorischen Gasvesikelproteine Strukturproteine sind (Shukla and DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Bis auf GvpH und GvpI sind alle essentiell für die Gasvesikelbildung. Möglicherweise fungiert GvpH als Helferprotein während der Gasvesikelbildung und GvpI ist an der Längenbestimmung der Gasvesikel beteiligt (Offner *et al.*, 2000). Das *gvpFGHIJKLM*-Transkript wird in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gebildet, noch vor der Hochregulation des *gvpA*-Transkripts durch GvpE. Daher wird vermutet, dass diese Proteine in frühen Phasen der Gasvesikelbildung involviert sind. Möglicherweise bilden die akzessorischen Gasvesikelproteine einen oder mehrere Komplexe, an denen GvpA assemblieren und den Gasvesikel bilden kann. Um diese Hypothese zu stützen, wurden in der Vergangenheit *in vitro* Untersuchungen der Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gasvesikelproteine durchgeführt (Tavlaridou *et al.*, 2014). Diese identifizierten GvpH, GvpJ und GvpL als Interaktionspartner von GvpM. Eine Interaktion von GvpM und GvpG konnte nicht nachgewiesen werden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war ein Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine und dem Hauptstrukturprotein GvpA zu erstellen, um ein besseres Verständnis über die frühen Mechanismen der Gasvesikelbildung zu erlangen.

5.1. Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gasvesikelproteine via 6x-Histidin-tag

Die Untersuchung wurde wie in Tavlaridou *et al.*, 2014 beschrieben durchgeführt. Die Leserahmen, die für die akzessorischen Gasvesikelproteine kodieren, wurden über die Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in den Expressionsvektor pET28a(+) inseriert und in *E. coli* BL21 codon+ exprimiert. Die Insertion der *gvp*-Leserahmen führt zur Fusion der jeweiligen Leserahmen mit einem 5'-gelegenen 6xHis-tag. Durch

den *T7*-Promotor, der unter der Kontrolle einer *lac*-Operator-Sequenz steht, wird die Expressionsrate angetrieben. Die Zugabe von IPTG führt zur Inaktivierung des Lac-Repressors, wodurch die Expression induziert wird. Im Anschluss wurden die HisGvp-Fusionsproteine denaturierend in Anwesenheit von 8 M Harnstoff mittels Ni-NTA-Agarose gereinigt. Zur Renaturierung wurden die gereinigten Proteine schrittweise mit sinkender Harnstoff- und steigender Kaliumchloridkonzentration dialysiert. Die Qualität der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE und einer anschließenden Coomassie-Färbung überprüft (Abbildung 7).

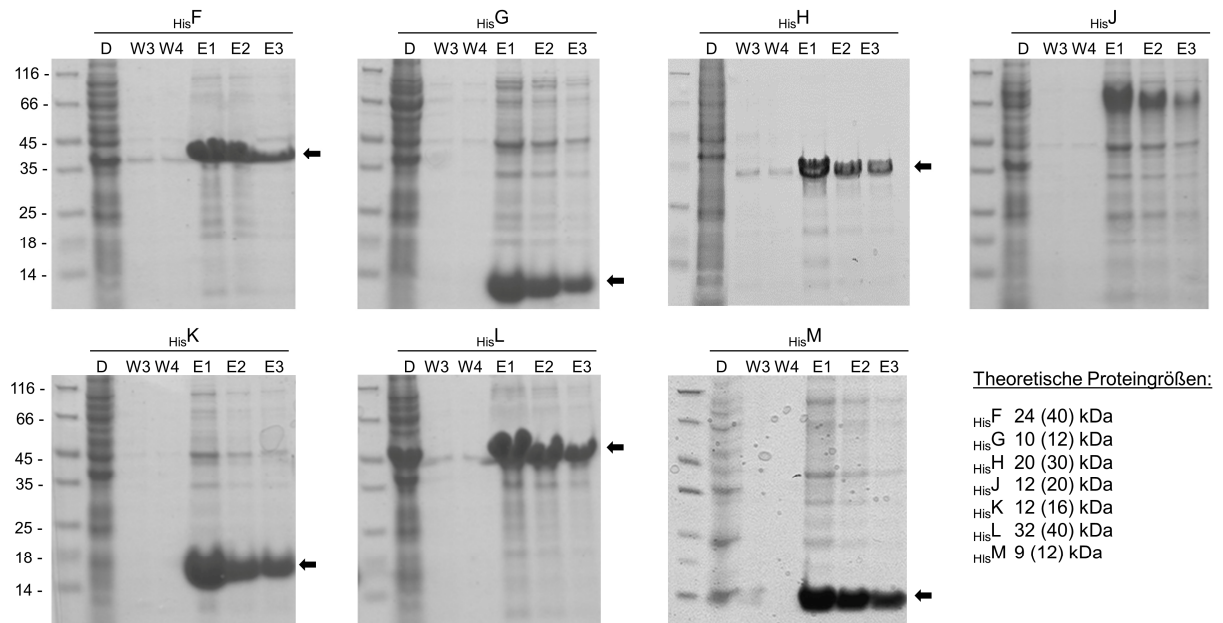


Abbildung 7: Coomassie-Färbung der Proteinreinigung der HisGvp-Fusionsproteine. Es wurden jeweils 15 µl des Durchflusses (D), der letzten beiden Waschfraktionen (W3, W4) und der drei Elutionsfraktionen (E1-3) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die erwarteten Proteingrößen. In der Tabelle sind die jeweilige theoretischen Proteingrößen der Fusionsproteine angegeben. Durch die Anpassung an hochmolare Salzkonzentrationen zeigen halophile Proteine ein verändertes Laufverhalten, welches in Klammern dargestellt ist. Die Bilder wurden nach schwarz-weiß invertiert.

In den Elutionsfraktionen der Proteinreinigung von HisF, HisG, HisH, HisK, HisL und HisM wurden jeweils die gesuchten Proteingrößen mittels Coomassie-Färbung identifiziert (Abbildung 7). In den Elutionsfraktionen der Proteinreinigung von HisJ (12 bzw. 20 kDa) konnte jedoch einzig eine dominante Proteingröße von etwa 70 kDa festgestellt werden, die auf ein Proteinaggregat schließen lässt. Darüber hinaus ist auffällig, dass neben den gesuchten Proteingrößen diverse zusätzliche Banden zu finden sind (Abbildung 7). Möglicherweise handelt es sich bei den undefinierten Proteingrößen um unspezifisch gebundene *E. coli*-Proteine. Ungeachtet dessen konnten alle HisGvp-Fusionsproteine in *E. coli* synthetisiert und mittels His-tag-Affinitätschromatografie gereinigt werden.

Die gereinigten und renaturierten HisGvp-Proteine wurden zur Herstellung einer HisGvp-Affinitätsmatrix verwendet, welche mit einem Gesamtzellextrakt einer *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten inkubiert wurde, die den putativen Interaktionspartner synthetisiert. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.4.10 beschrieben. Zur Identifikation der Interaktionspartner wurde die letzte

Waschfraktion und die beiden Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Membran mit einem Gvp-Antiserum inkubiert, das den Interaktionspartner detektiert (Abbildung 8). Neben dem Gesamtzellextrakt der *Hfx. volcanii*-Transformante (Ladekontrolle X), die das Gen für den putativen Interaktionspartner exprimiert, wurde zusätzlich als Ladekontrolle das aus *E. coli* gereinigte und renaturierte HisGvp-Fusionsprotein, das zur Herstellung der Affinitätsmatrix verwendet wurde, aufgetragen (Ladekontrolle HisX; Abbildung 8).

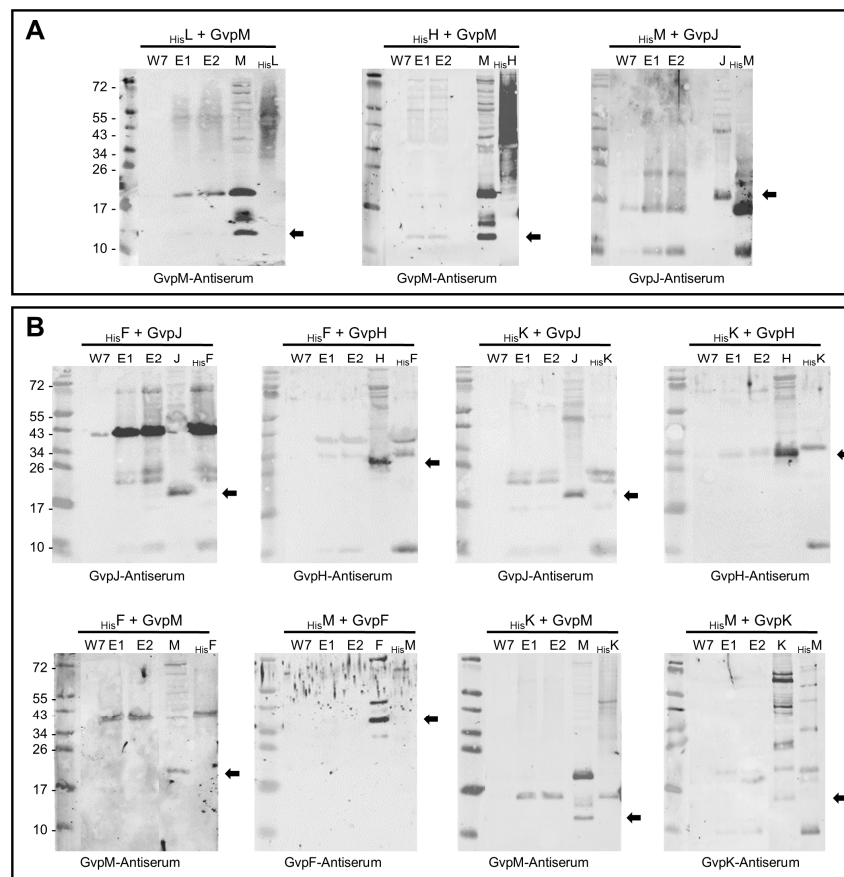


Abbildung 8: Western-Analysen der *in vitro* Interaktionsstudien unter der Verwendung eines 6xHistidin-tags. **A** Wiederholung der *in vitro* Interaktionsstudien von Tavlaridou *et al.*, 2014 mit zusätzlicher Ladekontrolle HisX. **B** In dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Interaktionsstudien. Aufgetragen wurden jeweils 15 µl der letzten Waschfraktion (W7) und der Elutionsfraktionen (E1, E2). Als Ladekontrolle wurden jeweils 20 µg des Gesamtzellysates einer *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten, die den putativen Interaktionspartner synthetisiert, und 5 ng des gereinigten und renaturierten HisGvp-Fusionsproteins, das zur Herstellung der Affinitätsmatrix verwendet wurde, aufgetragen. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den jeweiligen Gvp-Antiseren inkubiert, die unterhalb der Analysen angegeben sind. Zur Visualisierung wurde der IRDye 800CW Sekundärantikörper (Licor) verwendet, der mit einem Fluorophor gekoppelt ist und im Nah-Infrarotbereich (800 nm) detektiert werden kann. Die erwarteten Gvp-Monomere sind mit einem Pfeil markiert. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert.

Zur Überprüfung der Methode wurden die *in vitro* Protein-Protein Interaktionsstudien von Tavlaridou *et al.*, 2014 wiederholt (Abbildung 8A). In den Western-Analysen der Interaktionsstudien von HisL+GvpM bzw. HisH+GvpM inkubiert mit einem GvpM-Antiserum konnte in den Elutionsfraktionen sowie der Ladekontrolle M (Gesamtzellextrakt einer *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten, die GvpM synthetisiert) in beiden Fällen das GvpM-Monomer (12 kDa) und -Dimer (20 kDa) detektiert werden

(Abbildung 8A). Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von Tavlaridou *et al.*, 2014. Im Gegensatz dazu konnte eine Interaktion von HisM und GvpJ nicht eindeutig festgestellt werden. In der Western-Analyse der Elutionsfraktionen von $\text{HisM}+\text{GvpJ}$ inkubiert mit einem GvpJ-Antiserum wurden drei Proteingrößen (10, 16 und 25 kDa) identifiziert. Diese wurden ebenfalls in der Studie von Tavlaridou *et al.*, 2014 detektiert. Jedoch entspricht keine der detektierten Proteingrößen der erwarteten Proteingröße von GvpJ (Abbildung 8A, Ladekontrolle J). Durch den Vergleich der detektierten Proteingrößen in den Elutionsfraktionen mit der Ladekontrolle HisM (aus *E. coli* gereinigtes und renaturiertes HisM) wird deutlich, dass es sich bei den identifizierten Proteingrößen nicht um das gesuchte GvpJ handelt, sondern um HisM , dass offenbar mit dem GvpJ-Antiserum detektiert werden kann (Abbildung 8A). Als Folge dessen relativieren die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Ergebnisse von Tavlaridou *et al.*, 2014.

Darüber hinaus wurden die *in vitro* Protein-Protein Interaktionen von $\text{HisF}+\text{GvpJ}$, $+\text{GvpH}$ und $+\text{GvpM}$; $\text{HisK}+\text{GvpJ}$, $+\text{GvpH}$ und $+\text{GvpM}$ und die Interaktionen von $\text{HisM}+\text{GvpF}$ und $+\text{GvpK}$ untersucht (Abbildung 8B). Die Western-Analysen wurden jeweils mit den Gvp-Antiseren inkubiert, die einerseits die putativen Interaktionspartner und andererseits die HisGvp -Fusionsproteine detektieren. Da in allen Western-Analysen die jeweiligen HisGvp -Proteine nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), sind in Abbildung 8B nur die Western-Analyse dargestellt, die die putativen Interaktionspartner detektieren. In allen Untersuchungen, außer $\text{HisK}+\text{GvpH}$ bzw. $\text{HisM}+\text{GvpF}$, wurden sowohl in den Elutionsfraktionen als auch den Ladekontrollen HisX identische Proteingrößen detektiert, die nicht den gesuchten putativen Interaktionspartnern entsprachen (Abbildung 8B). In den Ladekontrollen X konnten dagegen die gesuchten Proteingrößen detektiert werden (Abbildung 8B). Somit handelt es sich bei den in den Elutionsfraktionen detektierten Proteingrößen ebenfalls um eine Kreuzreaktivität der Gvp-Antiseren mit den HisGvp -Fusionsproteinen. Demzufolge ist eine eindeutige Aussage über die Interaktionen der untersuchten Proteine nicht möglich.

In der Western-Analyse von $\text{HisM}+\text{GvpF}$ konnten sowohl in den Elutionsfraktionen als auch in der Ladekontrolle HisM keine Proteingrößen detektiert werden (Abbildung 8B). In der Ladekontrolle F wurde jedoch eindeutig GvpF nachgewiesen (Abbildung 8B). Dies impliziert, dass das GvpF-Antiserum keine Kreuzreaktivität gegenüber HisM besitzt. Da in den Elutionsfraktionen jedoch ebenfalls keine Proteingrößen detektiert werden konnten, ist eine Protein-Protein Interaktion von HisM und GvpF nicht nachweisbar.

In der Western-Analyse von $\text{HisK}+\text{GvpH}$ wurde sowohl in den Elutionsfraktionen als auch in der Ladekontrolle H die gesuchte Proteingröße für GvpH (ca. 30 kDa) detektiert (Abbildung 8B). In der Ladekontrolle HisK wurde eine Proteingröße von etwa 35 kDa detektiert (Abbildung 8B). Somit zeigt das GvpH-Antiserum eine Kreuzreaktivität gegenüber HisK . Diese ist jedoch deutlich von der gesuchten Proteingröße zu unterscheiden. Folglich wurde eine Interaktion von HisK und GvpH nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte einzig eine Interaktion von HisK und GvpH nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Interaktionen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Somit scheint diese Methode ungeeignet für den Nachweis von haloarchaealen Protein-Protein Interaktionen. Ein limitierender Faktor sind die verwendeten Gvp-Antiseren, die unspezifisch an die gereinigten und renaturierten HisGvp -Fusionsproteine binden. Die Begründung hierfür liegt vermutlich in der

Herstellungsart der Antiseren. Die jeweiligen Proteine wurden wie in Abschnitt 4.4.9 beschrieben gereinigt und Kaninchen damit immunisiert. Somit war der 6xHis-tag während der Immunisierung anwesend. Aus diesem Grund binden die verschiedenen Gvp-Antiseren vermutlich unspezifisch an Proteine, die Histidin-reiche Aminosäuresequenzen (wie die HisGvp-Proteine) besitzen. Folglich sind die vorhandenen Gvp-Antiseren für diese Untersuchungen ungeeignet. Eine weitere Limitierung ist die heterologe Expression in *E. coli* und die denaturierende Reinigung der HisGvp-Proteine. Es ist unklar, ob durch die Renaturierung die gereinigten Proteine ihre natürliche Konformation wiedererlangen, da die Gasvesikelproteine keine enzymatische Aktivität besitzen. Die natürliche Konformation ist jedoch essentiell für die Protein-Protein Interaktion. Zudem ist es bedenklich, dass beide zu untersuchenden Interaktionspartner in zwei unterschiedlichen Organismen (und auch Domänen) synthetisiert wurden. Daher wäre es von Vorteil eine Methode zu etablieren, in der beide Interaktionspartner in *Hfx. volcanii* synthetisiert werden. Zusätzlich wäre es erstrebenswert die Protein-Protein Interaktionen nativ und/oder *in vivo* zu untersuchen, ohne die Verwendung eines Histidin-tags.

5.2. Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gasvesikelproteine via Cellulose-Bindedomäne-tag

Um die Problematiken aus Abschnitt 5.1 zu umgehen und die Interaktionen unter nativen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Cellulose-Bindedomäne (CBD) des CipB Proteins des Cellulosoms von *Clostridium thermocellum* als Fusionstag verwendet. Dieses besitzt den Vorteil, unter Hochsalzbedingungen, wie die des *Hfx. volcanii*-Cytoplasmas, stabil zu sein (Ortenberg and Mevarech, 2000). Zur Fusionierung der Cellulose-Bindedomäne an die verschiedenen gvp-Leserahmen wurde der shuttle-Vektor pCBD hergestellt (Abbildung 9). Der cbd-Leserahmen wurde aus dem Vektor pWL-CBD-sec11b (Fine *et al.*, 2006) mit den in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten Oligonukleotiden amplifiziert und in den shuttle-Vektor pWL_{fdx} (Scheuch and Pfeifer, 2007) über die Schnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I inseriert. Die daraus resultierenden zwei *cloning sites* stromaufwärts und -abwärts des cbd-Leserahmens konnten dazu verwendet werden, die gvp-Leserahmen entweder N- oder C-terminal mit der CBD zu fusionieren (CBDX; X_{CBD} mit X = jeweils verwendetes Gvp-Protein). Für eine N-terminale Fusionierung der gvp-Leserahmen wurden die Schnittstellen *Xba*I und *Kpn*I verwendet, für eine C-terminale Fusionierung *Nco*I und *Bam*HI (Abbildung 9). Die Expression der fusionierten Gene stand unter der Kontrolle des haloarchaealen *P_{fdx}*-Promotors (Pfeifer *et al.*, 1993). Zusätzlich besitzt der pCBD-Vektor zwei verschiedene Replikationsursprünge: einen zur Replikation in *Hfx. volcanii* WR340 (pHV2 ori) und einen zur Replikation in *E. coli* (ColE1 ori).

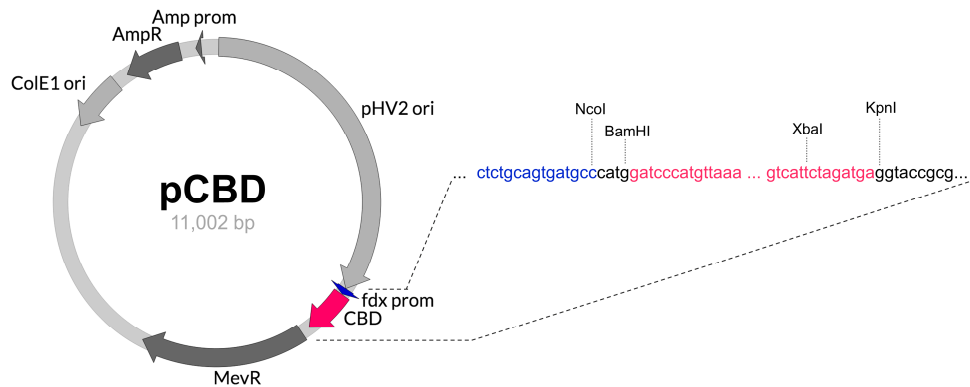


Abbildung 9: Plasmidkarte des *shuttle*-Vektors pCBD. Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen, die stromaufwärts und -abwärts des *cbd*-Leserahmens für die Insertion der *gvp*-Leserahmen verwendet werden können.

5.2.1. Reinigung der CBD-Fusionsproteine

Zur nativen Proteinreinigung der akzessorischen Gasvesikelpoteine GvpF, GvpG, GvpH, GvpI, GvpJ, GvpK, GvpL und GvpM wurden die jeweiligen *gvp*-Leserahmen mit den in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten synthetischen Oligonukleotiden, mit den jeweiligen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen als Überhangsequenz, aus der p-vac Region von *Hbt. salinarum* PHH1 amplifiziert und über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI* (X_{CBD}) oder *XbaI* und *KpnI* ($_{CBD}X$) in den Vektor pCBD inseriert. *Hfx. volcanii* wurde mit den resultierenden Plasmiden transformiert und die Proteinreinigung wie in Abschnitt 4.4.11 durchgeführt. Zur qualitativen Untersuchung der Proteinreinigung wurde das Gesamtzelllysate der Transformanten nach dem Ultraschallaufschluss, der Überstand und das Sediment nach der Ultrazentrifugation, der Durchfluss, sowie die letzte Waschfraktion und die beiden Elutionsfraktionen der Proteinreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine in den verschiedenen Fraktionen wurden zum einen mit kolloidalem Coomassie und zum anderen in Western-Analysen, inkubiert mit dem jeweiligen Gvp-Antiserum, visualisiert. Nachfolgend sind ausschließlich die Ergebnisse der N-terminal fusionierten Gasvesikelpoteine gezeigt, da die C-terminale Fusionierung identische Ergebnisse erzielte (Daten nicht gezeigt, Abbildung 10). Um sicherzustellen, dass *Hfx. volcanii* WR340 keine Proteine synthetisiert, die unspezifisch an die Cellulose-Matrix binden können, wurde die lösliche Proteinfraktion des untransformierten *Hfx. volcanii* WR340 mit der Cellulose-Matrix inkubiert und die Proteinreinigung wie oben beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis des Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgels zeigte keine unspezifische Bindung von *Hfx. volcanii*-Proteinen an die Matrix (Daten nicht gezeigt). Somit eignet sich dieser Stamm für die Reinigung von $_{CBD}Gvp$ -Fusionsproteinen.

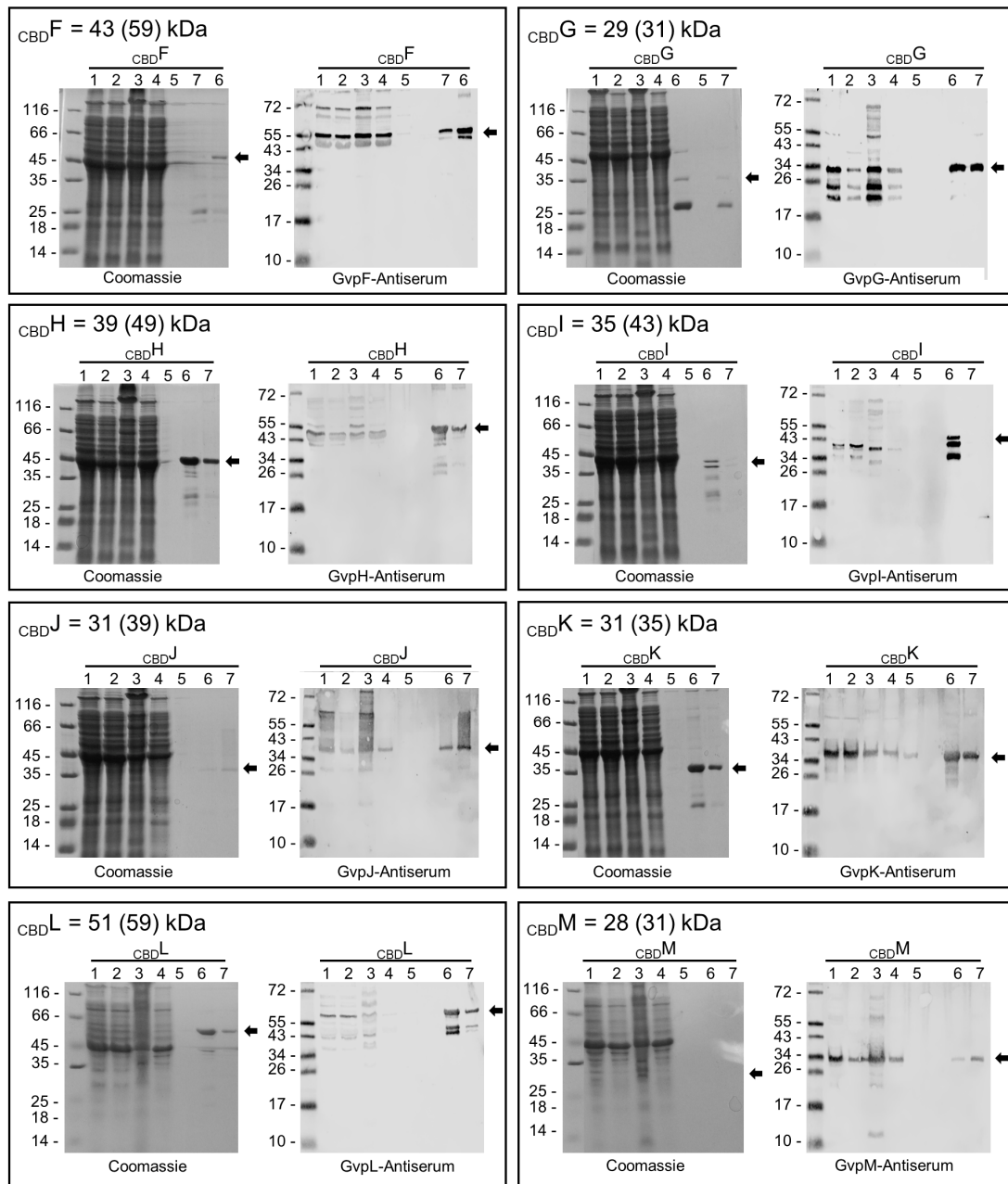


Abbildung 10: Proteinreinigung der $CBDGvp$ -Proteine mittels Cellulosematrix. Es wurden jeweils 15 μ l jeder Proteinfraktion in einer SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine mittels Coomassie angefärbt. Zusätzlich wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die gesuchten Fusionsproteine mit den jeweiligen Gvp-Antiseren inkubiert. Zur Visualisierung der Western-Analysen wurde ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper (IRDye 800CW, Licor) verwendet, der im Nah-Infrarotbereich (800 nm) angeregt werden kann. Die Blots und die Coomassie-gefärbten Gelbilder wurden nach schwarz-weiß invertiert. Die jeweiligen theoretischen Proteingrößen der Fusionsproteine sind über den Blots angegeben. Durch die Anpassung an hochmolekulare Salzkonzentrationen zeigen halophile Proteine ein verändertes Laufverhalten, welches in Klammern dargestellt ist. Zusätzlich zeigen die Pfeile jeweils die erwarteten Proteingrößen. Aufgetragene Proteinfractionen: 1 Gesamtzelllysat nach Ultraschallaufschluss; 2 Gesamtzelllysat nach Ultrazentrifugation; 3 Sediment nach Ultrazentrifugation; 4 Durchflussfraktion; 5 letzte Waschfraktion; 6 Elutionsfraktion 1; 7 Elutionsfraktion 2

Die qualitative Untersuchung der Proteinreinigung der $CBDGvp$ -Proteine ergab, dass alle akzessorischen Gasvesikelpoteine mit der in Abschnitt 4.4.11 dargestellten Methode gereinigt werden konnten. Die Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgele und Western-Analysen zeigten in allen Fällen die

gesuchten Proteingrößen (Abbildung 10). In den Coomassie-gefärbten Gelen der Proteinfractionen von CBD F , CBD G , CBD I und CBD K konnte neben den gesuchten Proteingrößen eine weitere bei ca. 25 kDa detektiert werden, die in Western-Analysen inkubiert mit einem GvpF-, GvpG-, GvpI- oder GvpK-Antiserum nicht detektiert werden konnte (Abbildung 10). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Proteingröße um ein Protein, das von *Hfx. volcanii* WR340 synthetisiert wird und mittels der oben genannten Gasvesikelproteine co-präzipitiert werden kann. Dabei ist es unklar, ob es sich in allen Fällen um das gleiche Protein handelt. In der Coomassie-Färbung der Proteinfractionen der Reinigung von CBD H und CBD L konnten ebenfalls neben den gesuchten Proteingrößen weitere Größen von ca. 30 und 40 kDa (CBD H) oder 40/45 kDa (CBD L) visualisiert werden, die ebenfalls in Western-Analysen inkubiert mit einem GvpH- oder GvpL-Antiserum detektiert werden konnten (Abbildung 10). Dies deutet daraufhin, dass es sich bei den additiven Proteingrößen um unfusioniertes GvpH und GvpL, oder Abbauprodukte dessen, handeln könnte.

Die Proteinreinigung der Fusionsproteine CBD J und CBD M stellte eine Ausnahme dar. Es ist bereits bekannt, dass GvpJ und GvpM sehr hydrophobe Proteine sind, die dazu tendieren Proteinaggregate zu bilden (Walsby, 1994; Tavlaridou *et al.*, 2014). In den Coomassie-gefärbten Proteinfractionen der CBD J - bzw. CBD M -Reinigung konnte nur sehr schwach CBD J bzw. kein CBD M visualisiert werden (Abbildung 10). In Western-Analysen inkubiert mit den jeweiligen Gvp-Antiseren konnten jedoch die gesuchten Proteingrößen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass nur geringe Mengen der Fusionsproteine gereinigt werden konnten. Auffällig ist auch, dass in den Western-Analysen nur wenig CBD J bzw. CBD M in der löslichen Proteinfraction nach dem Ultrazentrifugationsschritt im Vergleich zum Sediment festgestellt werden konnte (Abbildung 10). Dies unterstützt die Hypothese, dass CBD J und CBD M unlösliche oder membranständige Proteine sind, die bei einer Ultrazentrifugation sedimentiert werden. Um die Löslichkeit der beiden Fusionsproteine zu erhöhen wurden verschiedene Detergenzien eingesetzt. Dem Lysepuffer aus Abschnitt 4.4.3 wurde n-Dodecyl β -D-maltosid (DDM) in der Konzentration 1,4 mM und 10,4 mM und Octyl β -D-glycopyranosid (OGP) in der Konzentration 60 mM hinzugefügt. Die Reinigung wurde wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben durchgeführt, mit der Änderung, dass dem Waschpuffer das jeweilige Detergens in der gleichen Konzentration zugesetzt wurde. Zur qualitativen Kontrolle der Proteinreinigung wurden die verschiedenen Proteinfractionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-Färbungen und Western-Analysen durchgeführt (Abbildung 11). Beim Vergleich der löslichen Proteinfraction nach dem Ultrazentrifugationsschritt mit und ohne Detergenzien ist erkennbar, dass mit steigender Detergenzkonzentration die Proteinmenge von CBD J bzw. CBD M in der löslichen Proteinfraction zunimmt (Abbildung 11). Somit konnte die Löslichkeit von CBD J bzw. CBD M unter der Verwendung von DDM bzw. OGP verbessert werden. Als Folge dessen konnten auch die Proteinmenge in den jeweiligen Elutionsfraktionen gesteigert werden. Mit steigender Detergenzkonzentration sind die gesuchten Proteingrößen deutlicher erkennbar. Sowohl in der Elutionsfraktion von CBD J als auch CBD M konnte mit 60 mM OGP das deutlichste Ergebnis erzielt werden (Abbildung 11). Dennoch ist ein „Schmier“ in den Elutionsfraktionen von CBD J sowohl in der Coomassie-Färbung als auch in den Western-Analysen sichtbar, der darauf hindeutet, dass CBD J aggregiert und diese Aggregate weder durch DDM noch durch OGP aufgelöst werden können (Abbildung 11).

Zusätzlich ist eine Proteingröße von ca. 17 kDa sowohl in der Coomassie-Färbung als auch in der Western-Analyse erkennbar, die auf unfusioniertes GvpJ hindeuten könnte (Abbildung 11).

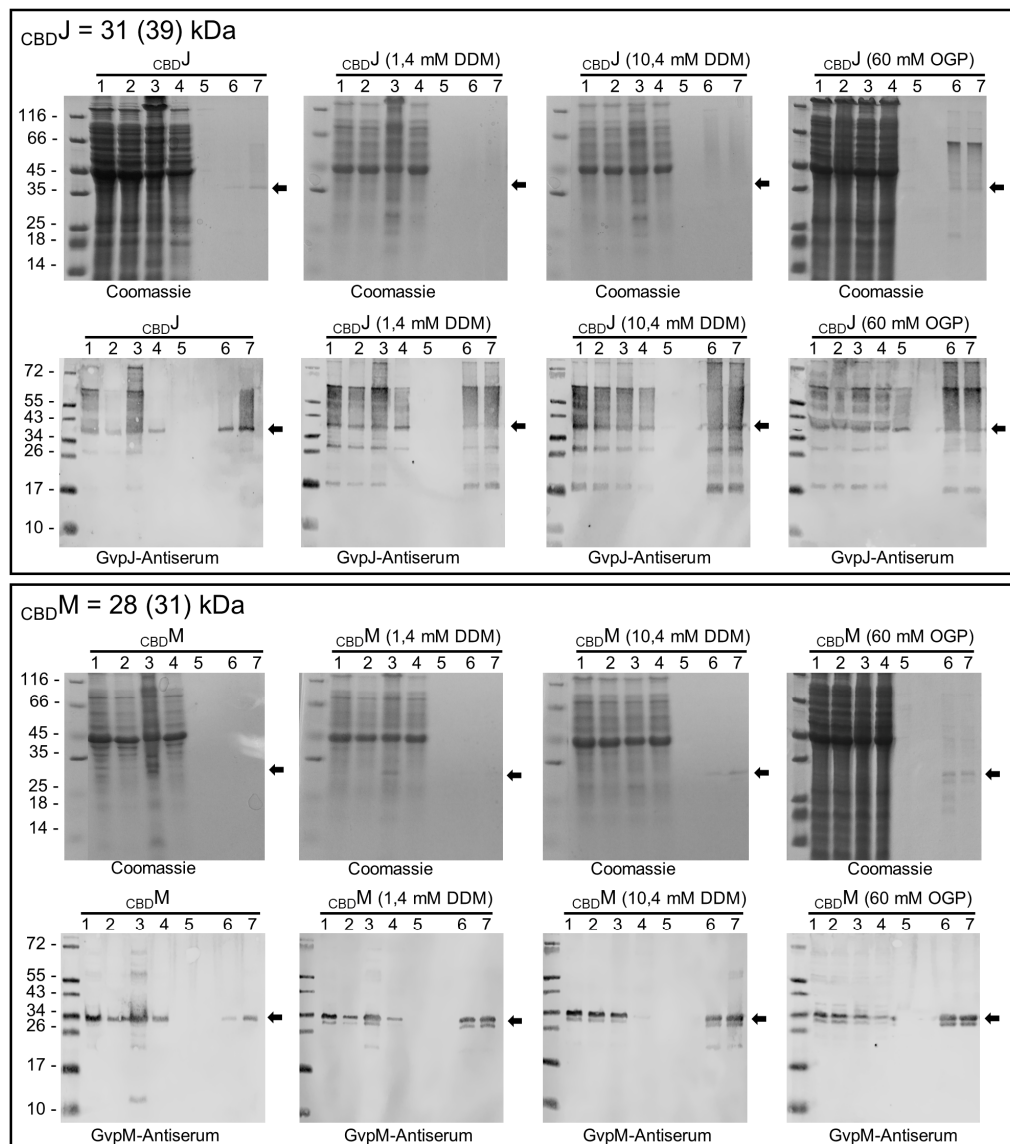


Abbildung 11: Proteinreinigung der Proteine $CBDJ$ und $CBDM$ mittels Cellulosematrix nach Zugabe verschiedener Detergenzien (DDM und OGP). Zur Verbesserung der Löslichkeit von $CBDJ$ bzw. $CBDM$ wurde n-Dodecyl β -D-maltosid (DDM) in verschiedenen Konzentrationen (1,4 mM und 10,4 mM) bzw. 60 mM Octyl β -D-glycopyranosid (OGP) dem Gesamtzelllysat beigefügt und die Fusionsproteine mittels Cellulosematrix aufgereinigt. Es wurden jeweils 15 μ l jeder Proteinfractionen in einer SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine mittels Coomassie angefärbt. Zusätzlich wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den jeweiligen Gvp-Antiseren inkubiert. Zur Visualisierung der Western-Analysen wurde ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper (IRDye 800CW, Licor) verwendet, der im Nah-Infrarotbereich (800 nm) angeregt werden kann. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. Die jeweiligen theoretischen Proteingrößen der Fusionsproteine sind über den Blots angegeben. Durch die Anpassung an hochmolare Salzkonzentrationen zeigen halophile Proteine ein verändertes Laufverhalten, welches in Klammern dargestellt ist. Zusätzlich zeigen die Pfeile jeweils die erwarteten Proteingrößen. Aufgetragene Proteinfractionen: 1 Gesamtzelllysat nach Ultraschallaufschluss; 2 Gesamtzelllysat nach Ultrazentrifugation; 3 Sediment nach Ultrazentrifugation; 4 Durchflussfraktion; 5 letzte Waschfraktion; 6 Elutionsfraktion 1; 7 Elutionsfraktion 2.

Darüber hinaus wurde von allen Elutionsfraktionen die Proteinmengen ermittelt (Tabelle 3). Mit der Proteinreinigung der löslichen Fusionsproteine **CBDF**, **CBDG**, **CBDH**, **CBDI**, **CBDK** und **CBDL** konnten Proteinmengen von 142 µg bis 484 µg erzielt werden. Unter der Verwendung von 10,4 mM DDM konnten Proteinmengen von 33 µg (**CBDM**) und 132 µg (**CBDJ**) erzielt werden, die im Vergleich zu den anderen **CBDGvp**-Proteinen am geringsten sind (Tabelle 3).

Tabelle 3: Proteinmengen der Reinigung der **CBDGvp**-Fusionsproteine. Die Standardabweichung errechnet sich aus 3 technischen und 2 biologischen Replikaten.

	Proteinmenge in µg		Proteinmenge in µg
CBDF	146 ± 44	CBDJ (1,4 mM DDM)	67 ± 14
CBDG	307 ± 41	CBDJ (10,4 mM DDM)	132 ± 20
CBDH	417 ± 86	CBDJ (60 mM OGP)	90 ± 9
CBDI	142 ± 18	CBDM (1,4 mM DDM)	14 ± 0
CBDJ	23 ± 5	CBDM (10,4 mM DDM)	33 ± 14
CBDK	214 ± 35	CBDM (60 mM OGP)	18 ± 5
CBDL	484 ± 21		
CBDM	13 ± 2		

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Proteinreinigung mittels Cellulose-Bindedomäne-*tag* und einer Cellulosematrix unter nativen Bedingungen möglich ist. Vergleichend zur denaturierenden Proteinreinigung unter der Verwendung eines 6xHistidin-*tags* und einer Ni-NTA-Matrix besitzen die Elutionsfraktionen eine hohe Reinheit.

5.2.2. Pulldown-Assay mittels Cellulose-Bindedomäne-*tag*

Die Pulldown-Assays wurden zur Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktionen via **CBD-*tag*** verwendet. Dazu wurde *Hfx. volcanii* WR340 simultan mit den in Abschnitt 5.2.1 hergestellten p**CBD**-Plasmiden, die die fusionierten *gvp*-Leserahmen enthalten, und dem Plasmid pJAS35, das den Leserahmen des putativen Interaktionspartners trägt, transformiert. Die Doppeltransformanten wurden in 400 ml VMH-Medium mit entsprechender Antibiotikasupplementation kultiviert, mittels Ultraschall lysiert und das Gesamtzelllysat mit einer Cellulosematrix aufgereinigt (Abschnitt 4.4.11). Im Falle einer Interaktion können sowohl das **CBD**-fusionierte Protein als auch der unfusionierte Interaktionspartner mittels Western-Analyse in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Zur qualitativen Untersuchung des Pulldown-Assays wurde der Durchfluss, die letzte Waschfraktion, die Elutionsfraktion und das Gesamtzelllysat auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den jeweiligen Gvp-Antiseren inkubiert. Zur Detektion wurde ein mit einem Fluorophor markierter Sekundärantikörper (IRDye 800CW Licor) verwendet. Um nachzuweisen, dass

die verschiedenen akzessorischen Gasvesikelproteine nicht mit der Cellulose-Bindedomäne interagieren, wurden *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten hergestellt, die die Plasmide pCBD (ohne inserierten *gvp*-Leserahmen) und pX x pJAS35 (mit jeweils inserierten *gvp*-Leserahmen) exprimieren. Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Wie erwartet konnte in keiner der Elutionsfraktionen das jeweilige Protein detektiert werden (Abbildung 12A). Somit kann die CBD als Fusionstag in den Pulldown-Assays zur Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen von haloarchaealen Gasvesikelproteinen verwendet werden.

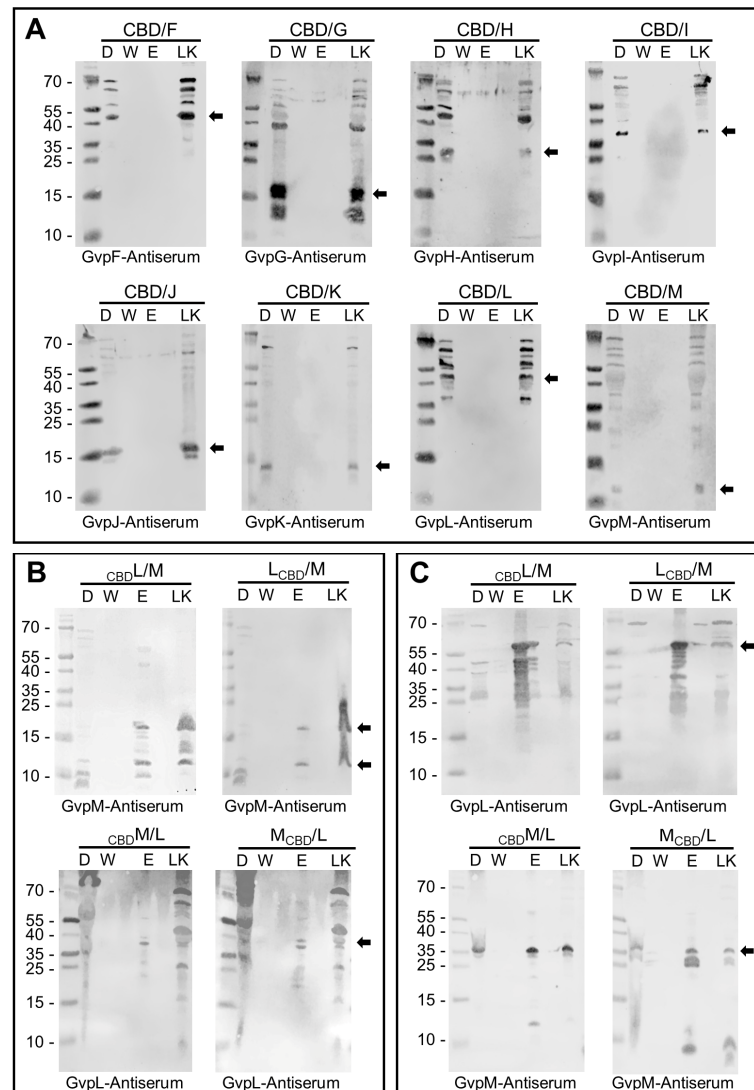


Abbildung 12: Western-Analysen der Pulldown-Assays der Negativkontrollen (A) und der L/M-Interaktionen (B, C). Aufgetragen wurden jeweils 20 µg des Durchflusses (D) und der Ladekontrollen (LK = Gesamtzelllysat der *Hfx. volcanii* WR340-Doppeltransformanten) sowie jeweils 15 µl der letzten Waschfraktion (W) und Elutionsfraktion (E). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den jeweiligen Gvp-Antiseren inkubiert, die unterhalb der Analysen angegeben sind. Zur Visualisierung wurde der IRDye 800CW Sekundärantikörper (Licor) verwendet, der mit einem Fluorophor gekoppelt ist und im Nah-Infrarotbereich (800 nm) detektiert werden kann. Die erwarteten Gvp-Monomere sind mit einem Pfeil markiert. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert.

Zunächst wurde die Interaktion von GvpL und GvpM untersucht, da bereits bekannt war, dass diese beiden Proteine interagieren (Tavlaridou *et al.*, 2014). Um sicherzustellen, dass die Position des Fusionstags keinen Einfluss auf das Interaktionsverhalten hat, wurde die Interaktion in vier möglichen Kombinationen getestet (CBDL/M; LCBD/M; CBDM/L; MCBD/L). Das Assay wurde wie in Abschnitt 4.4.11 beschrieben durchgeführt. Die Western-Analysen von CBDL/M und LCBD/M inkubiert mit einem GvpM-Antiserum zeigten wie erwartet sowohl in der Elutionsfraktion als auch in der Ladekontrolle (Gesamtzelllysat der *Hfx. volcanii*-Doppeltransformante) das GvpM-Monomer (ca. 12 kDa) und zusätzlich das GvpM-Dimer (ca. 20 kDa) (Abbildung 12B). In den Western-Analysen von CBDM/L und MCBD/L inkubiert mit einem GvpL-Antiserum konnte ebenfalls wie erwartet das GvpL-Monomer (ca. 40 kDa) in der Elutionsfraktion detektiert werden (Abbildung 12B). In den Ladekontrollen wurden zusätzlich zu dem GvpL-Monomer Proteingrößen von ca. 43 kDa, 55 kDa und 70 kDa detektiert. Diese Proteingrößen konnten ebenfalls in Western-Analysen von Gesamtzelllysaten von *Hfx. volcanii* inkubiert mit dem GvpL Antiserum (und einigen anderen Antiseren) detektiert werden und ist somit auf unspezifische Bindung der Antiseren zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten Proteingrößen von 15-25 kDa identifiziert werden, die möglicherweise Abbauprodukte darstellen. Bei den Western-Analysen inkubiert mit den Antiseren gegen die Fusionsproteine konnte jeweils CBDM bzw. MCBD (ca. 35 kDa) und CBDL bzw. LCBD (ca. 60 kDa) detektiert werden (Abbildung 12C). Neben der Proteingröße von CBDL bzw. LCBD wurde zusätzlich das GvpL-Monomer sowie Abbauprodukte identifiziert (Abbildung 12C).

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Cellulose-Bindedomäne die L/M-Interaktion verifiziert werden. Zudem wurde die Protein-Protein Interaktion durch die unterschiedliche Positionierung des Fusionstags nicht beeinflusst, weshalb im weiteren Verlauf die Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen der verbliebenen akzessorischen Gasvesikelpoteine mit den N-terminal fusionierten Gasvesikelpoteinen durchgeführt wurde.

Im Folgenden wurden die Interaktionen der verbliebenen akzessorischen Gasvesikelpoteine wie zuvor beschrieben untersucht. Untersucht wurden die Protein-Protein Interaktionen von GvpF, GvpG, GvpH, GvpI, GvpJ, GvpK, GvpL und GvpM untereinander, aber nicht mit sich selbst. Es wurden jedoch nicht alle möglichen Kombinationen getestet, sondern nur die in Abbildung 13 und Tabelle 4 angegebenen, da häufig schon bei einer Kombination eine Interaktion gefunden wurde. Zur Vereinfachung werden die fusionierten Gasvesikelpoteine im Nachfolgenden mit CBDX zusammengefasst. Zudem ist aus übersichtlichen Gründen nur die Western-Analyse der Elutionsfraktionen, inkubiert mit dem Antiserum gegen den unfusionierten Interaktionspartner, dargestellt (Abbildung 13). In nahezu allen Western-Analysen der durchgeführten Pulldown-Assays konnten die erwarteten Proteingrößen der Interaktionspartner nachgewiesen werden (Abbildung 13). In den Western-Analysen der Pulldown-Assays von GvpG mit CBDX, inkubiert mit einem GvpG-Antiserum, konnte in den meisten Fällen nur das GvpG-Dimer (ca. 20 kDa) detektiert werden (Abbildung 13). Bei der Interaktion von CBDI/G wurde zusätzlich eine weitere Proteingröße von ca. 25 kDa identifiziert. In den Western-Analysen der Interaktionen von GvpH mit CBDX, inkubiert mit einem GvpH-Antiserum, ist bei der Interaktion CBDI/H neben dem GvpH-Monomer eine weitere Bande bei ca. 60 kDa sichtbar (Abbildung 13). Diese deutet

möglicherweise auf ein GvpH-Dimer hin. In den Western-Analysen der Interaktionen von GvpJ und CBDX , inkubiert mit einem GvpJ-Antiserum, ist auffällig, dass GvpJ in Anwesenheit von CBD F , CBD H , CBD I und CBD M zu unspezifischer Aggregatbildung neigt, in Anwesenheit von CBD G und CBD L hingegen überwiegend das GvpJ-Monomer sichtbar ist (Abbildung 13). Die Western-Analysen der Interaktion von GvpK mit CBD X bzw. X_{CBD} , inkubiert mit einem GvpK-Antiserum, zeigen, dass GvpK in den Pulldown-Assays mit F_{CBD} und CBD G nur sehr schwach nachweisbar ist (Abbildung 13). Zudem konnten zusätzlich zu den GvpK-Monomeren Banden bei ca. 45 kDa detektiert werden, die auf GvpK-Multimere hindeuten. Darüber hinaus wurde in der Western-Analyse der Interaktion CBD I/K das GvpK-Dimer und zusätzlich am Gelrand eine starke Reaktion des GvpK-Antiserums, das möglicherweise auf Multimerisierung hindeutet, detektiert (Abbildung 13). Auffällig sind die Western-Analysen von GvpL mit CBD X , inkubiert mit einem GvpL-Antiserum (Abbildung 13). Neben der erwarteten Proteingröße von GvpL (40 kDa) konnten in der Western-Analyse der Interaktion von CBD F/L weitere Größen bei ca. 43 kDa, 50/55 kDa und 70 kDa detektiert werden (Abbildung 13). Dies zusätzlichen Banden sind, wie oben erwähnt, auf unspezifische Bindung des GvpL-Antiserums zurückzuführen. In der Western-Analyse der Interaktion CBD H/L konnte nur eine Proteingröße von 20/25 kDa, aber nicht die erwartete Größe von 40 kDa detektiert werden (Abbildung 13). Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Abbauprodukt von GvpL. Auch in der Western-Analyse von CBD I/L konnte keine Proteingröße für GvpL detektiert werden, lediglich die unspezifischen Größen bei 43 kDa, 50/55 kDa und 70 kDa. In den Western-Analysen der Interaktion von GvpM mit CBD X , inkubiert mit einem GvpM-Antiserum, konnten wie erwartet das GvpM-Monomer und -Dimer detektiert werden. In der Western-Analyse der Interaktion CBD H/M wurde jedoch ausschließlich das Monomer identifiziert (Abbildung 13). Dies wurde bereits in früheren Studien beobachtet (Tavlaridou *et al.*, 2013; Tavlaridou *et al.*, 2014). Es wurde geschlussfolgert, dass GvpH als Helferprotein agiert und GvpM in Lösung hält. Bei der Western-Analyse der Interaktion CBD I/M konnte

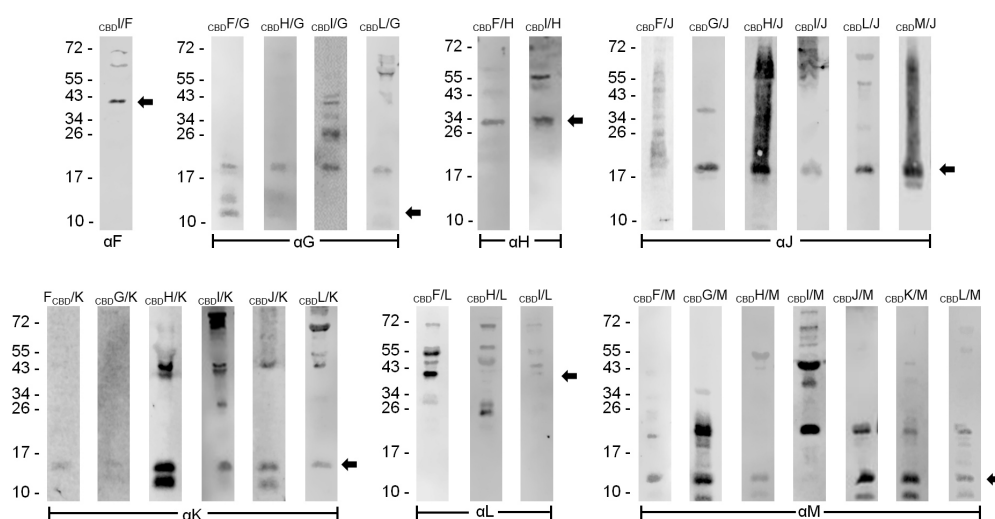


Abbildung 13: Western-Analysen aller Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelpoteine unter der Verwendung des Cellulose-Bindedomäne-tags. Exemplarisch ist von jeder Interaktion nur die Elutionsfraktion dargestellt. Es wurden jeweils 15 μl der Elutionsfraktionen auf eine SDS-PAGE aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den unter den Blots dargestellten Gvp-Antiseren inkubiert. Zur Visualisierung der putativen Interaktionspartner wurde der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper IRDye 800CW (Licor) verwendet, der im Nah-Infrarotbereich (800 nm) angeregt werden kann. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. Die Pfeile markieren jeweils die erwarteten Größen der Gvp-Monomere.

ausschließlich das GvpM-Dimer und eine zusätzliche dominante Proteingröße bei ca. 50 kDa detektiert werden (Abbildung 13). Darüber hinaus sind weitere größere Banden in geringerer Intensität erkennbar. Womöglich handelt es sich bei den zusätzlichen Größen um GvpM-Multimere. Insgesamt war auffällig, dass GvpG, GvpH, GvpJ, GvpK und GvpM in Anwesenheit von CBDI zur Multimerisierung neigen. Eine zusammenfassende Übersicht der untersuchten Interaktionen kann der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Western-Analysen aller Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteine unter der Verwendung des Cellulose-Bindedomäne-tags. Angegeben sind nur die Interaktionen, die in den Pulldown-Assays analysiert wurden. Die in der Tabelle angegebenen GvpX zeigen an, welches Gvp-Antiserum in der Western-Analyse verwendet wurde. Grau markierte GvpX deuten auf uneindeutige Ergebnisse hin.

	GvpF	GvpG	GvpH	GvpI	GvpJ	GvpK	GvpL	GvpM
^F / CBD ^F CBD		GvpG	GvpH	+	GvpJ (Aggregation)	GvpK (schwach)	GvpL	GvpM
^G CBD	+		+	+	GvpJ (Monomer + Dimer)	GvpK (schwach)	+	GvpM
^H CBD	+	GvpG (Dimer)		+	GvpJ (Aggregation)	GvpK	(GvpL) (unspezifische Banden)	GvpM (Monomer)
^I CBD	GvpF	GvpG (Dimer + Multimere)	GvpH (Monomer + Dimer)		GvpJ (Monomer + Multimere am Gelrand)	GvpK (Monomer, Dimer + Multimere)	(GvpL) (schwache Banden)	GvpM (Dimer + Multimere)
^J CBD	+	+	+	+		GvpK	+	GvpM
^K CBD	+	+	+	+	+		+	GvpM
^L CBD	+	GvpG (Dimer)	(-)	(-)	GvpJ (Monomer)	GvpK		GvpM
^M CBD	+	+	+	+	GvpJ (Aggregation)	+	+	

+ = eine Interaktion wurde nachgewiesen, aber in anderer Kombination

- = eine Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden

() = uneindeutiges Ergebnis

Zusammenfassend ist die Verwendung der Cellulose-Bindedomäne von *Clostridium thermocellum* als Fusionstag eine gute Methode zum Nachweis von *in vivo* Protein-Protein Interaktionen in *Haloferax volcanii*. Vergleichend zu den Ergebnissen mit den *in vitro* Protein-Protein Interaktionsstudien von Tavlaridou *et al.*, 2014 konnte die Interaktion von GvpL, GvpJ und GvpH mit GvpM verifiziert werden. Widersprüchlich ist jedoch, dass in dieser Studie eindeutig eine Interaktion zwischen GvpM und GvpG festgestellt werden konnte. Daher erscheint es relevant, in welchem Organismus die Fusionsproteine synthetisiert wurden, bzw. ob die Interaktion *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt wurde. In der Studie von Tavlaridou *et al.*, 2014 wurden die Fusionsproteine heterolog in

E. coli hergestellt und denaturierend gereinigt. Nach erfolgter Renaturierung in Hochsalz wurden Pulldown-Assays mit Gesamtzelllysaten aus *Hfx. volcanii*-Transformanten, die den putativen Interaktionspartner synthetisierten, durchgeführt. Somit wurden die Interaktionspartner in zwei unterschiedlichen Organismen hergestellt und die zu untersuchenden Proteine interagierten ausschließlich *in vitro*. In dieser Arbeit wurden die Interaktionspartner jedoch im selben Organismus (*Hfx. volcanii*) synthetisiert und die Interaktion erfolgte *in vivo*. Der Pulldown-Assay diente einzig zum Nachweis der Interaktion. Die Position des Fusionstags an die verschiedenen Gasvesikelproteine hat dabei keinen Einfluss auf das Interaktionsverhalten. Die Durchführung der Pulldown-Assays der zusätzlichen von Tavlaridou *et al.* noch nicht untersuchten Protein-Protein Interaktionen zeigte, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine miteinander interagieren können. Lediglich die Interaktion von GvpL mit GvpH und GvpI ist fraglich. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass die akzessorischen Gasvesikelproteine möglicherweise einen oder mehrere Proteinkomplexe zu Beginn oder während der Gasvesikelbildung bilden.

5.2.3. Isolation des putativen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine

Zum Nachweis einer möglichen Komplexbildung der akzessorischen Gasvesikelproteine wurde eine *Hfx. volcanii*-Doppeltransformante hergestellt, die zum einen das Plasmid p_{CBD}M und zum anderen das Plasmid pF-L^{ex} (enthält alle Leserahmen der akzessorischen Gasvesikelproteine, bis auf *gvpM*, inseriert in pJAS35) exprimiert. Anschließend wurde die _{CBD}M/F-L-Doppeltransformante wie in Abschnitt 4.4.11 beschrieben kultiviert und analysiert. In diesem Fall fungiert _{CBD}M als *bait*-Protein und die akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, GvpG, GvpH, GvpI, GvpJ, GvpK und GvpL zeitgleich als *prey*-Proteine. Zur Vereinfachung wurde wie auch schon in Abschnitt 5.2.2 nur die Western-Analysen der Elutionsfraktion in Abbildung 14 dargestellt.

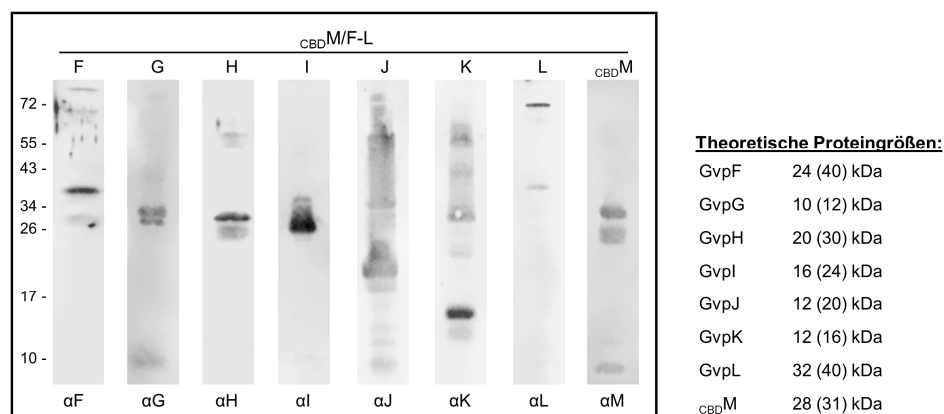


Abbildung 14: Western-Analyse der _{CBD}M/F-L-Transformanten. Es wurden jeweils 15 µl der Elutionsfraktionen auf eine SDS-PAGE aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den unter den Blots dargestellt Gvp-Antiseren inkubiert. Zur Visualisierung der putativen Interaktionspartner wurde der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper IRDye 800CW (Licor) verwendet, der im Nah-Infrarotbereich (800 nm) angeregt werden kann. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert. In der Tabelle sind die jeweilige theoretischen Proteingrößen angegeben. Durch die Anpassung an hochmolekulare Salzkonzentrationen zeigen halophile Proteine ein verändertes Laufverhalten, welches in Klammern dargestellt ist.

Die Western-Analysen der Elutionsfraktion zeigten in allen Fällen die erwarteten Proteingrößen (Abbildung 14). Eine Ausnahme bildete die Western-Analyse inkubiert mit einem GvpG-Antiserum. Statt der erwarteten Proteingröße von ca. 12 kDa wurde eine Proteingröße von ca. 34 kDa detektiert (Abbildung 14). Es ist unklar, ob es sich hierbei um ein GvpG-Multimer oder um eine unspezifische Bindung des GvpG-Antiserums an ein anderes, in der Elutionsfraktion enthaltenes Protein, handelt.

Somit konnte unter der Verwendung von *CBDM* als *bait*-Protein die akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, GvpH, GvpI, GvpJ, GvpK und GvpL und eventuell auch GvpG co-präzipitiert werden. Unter Berücksichtigung der in Abschnitt 5.2.2 erzielten Ergebnisse, dass GvpM mit allen akzessorischen Gasvesikelproteinen interagieren kann, ist es jedoch unklar, ob diese Proteine ausschließlich *CBDM* binden oder ob diese einen oder mehrere Proteinkomplexe bilden.

5.3. *In vivo* Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteinen mittels split-GFP

Split-GFP ist bereits eine etablierte Methode zum *in vivo* Nachweis verschiedener Arten von Interaktionen in Bakterien und Eukaryoten (Magliery *et al.*, 2004; Finnigan *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). In Archaea, insbesondere in Haloarchaea, konnte diese Methode jedoch bisher nicht angewandt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese an *Hfx. volcanii* anzupassen, um somit Protein-Protein Interaktionen von Gasvesikelproteinen *in vivo* und in Hochsalz zu untersuchen. Dazu wurde in das salzstabile smRS-GFP (mGFP) (Reuter and Maupin-Furlow, 2004) die Punktmutation F64L eingefügt, was zu einer 2,5-fach erhöhten Fluoreszenz in *Hfx. volcanii*-Transformanten führte (Born and Pfeifer, 2019). Das daraus resultierende mGFP2 wurde in dieser Arbeit zwischen dem siebten und achten β -Faltblatt geteilt. Daraufhin wurden die Fragmente NGFP (aa 1-157) und CGFP (aa 158-239) an die zu untersuchenden Gasvesikelproteine fusioniert. Interagieren diese, assemblieren die GFP-Fragmente zu einem funktionalen GFP und die Fluoreszenz kann, wie in Abschnitt 4.4.12 beschrieben, in der Zelle relativ quantifiziert werden.

5.3.1. Etablierung der split-GFP Methode

Zur Herstellung der Expressionsvektoren wurde der *ngfp*- bzw. *cgfp*-Leserahmen mit Hilfe der in Abschnitt 4.1.4 aufgelisteten Oligonukleotide und unter der Verwendung des Plasmids pP2JB87 (enthält den *mgfp2*-Leserahmen; Johannes Born, unveröffentlicht) amplifiziert. Das Amplifikat *BspHI-ngfp-BlnI* wurde in den *shuttle*-Vektor pJAS35 bzw. das Amplifikat *NcoI-cgfp-KpnI* in den *shuttle*-Vektor pWL_{fdx} inseriert. Zur Gewährleistung, dass die Fusionsproteine in ähnlichen Mengen synthetisiert werden, besitzen die beiden *shuttle*-Vektoren eine ähnliche Kopienzahl (Charlebois *et al.*, 1987; Holmes and Dyall-Smith, 1990) und die Synthese der jeweiligen Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des *P_{fdx}*-Promotors (Pfeifer *et al.*, 1993). Zusätzlich enthalten die synthetischen Oligonukleotide die Linker-

Als Basis für die neuen Vektoren wurden ebenfalls die beiden *shuttle*-Vektoren pJAS35 und pWL_{fdx} verwendet. Die synthetischen Oligonukleotide, die zur Amplifikation der jeweiligen GFP-Fragmente verwendet wurden, enthielten die expandierten Linkersequenzen (Abschnitt 4.1.4). Die Linker-Region in den pJAS-abgeleiteten Vektoren besitzt eine Länge von 14 Aminosäuren [(GGSGSGS)₂], und die Linker-Region in den pWL-abgeleiteten Vektoren 16 Aminosäuren [(GGSG)₄]. Durch das Einfügen zusätzlicher Restriktionsschnittstellen ergeben sich Linkerlängen von 15 bis 19 aa (Abbildung 15). Die Amplifikate *BspHI-ngfp-link-BlnI* und *NcoI-link-ngfp-KpnI* wurden in den Expressionsvektor pJAS35 und die Amplifikate *NcoI-link-cgfp-KpnI* und *NcoI-cgfp-link-KpnI* in pWL_{fdx} eingefügt. Die *gvp*-Leserahmen wurden mit Hilfe der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 amplifiziert. Die synthetischen Oligonukleotide enthielten die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen als Überhangsequenzen (Abschnitt 4.1.4). Das *NcoI-gvp-BlnI*-Fragment wurde in die Expressionsplasmide pJAS-NGFP-Nterm und pJAS-NGFP-Cterm eingefügt. Für die Insertion der *gvp*-Leserahmen in pWL-CGFP-Cterm wurden die Restriktionsstellen *NcoI* und *BamHI* verwendet, und *BamHI* und *KpnI* für die Insertion in pWL-CGFP-Nterm (Abbildung 15). *Hfx. volcanii* wurde gleichzeitig mit beiden kompatiblen Vektorplasmiden transformiert und die Anwesenheit beider Plasmide mittels PCR und Western-Analyse bestätigt.

Um einen möglichen Effekt der Fusionsposition der GFP-Fragmente auf das Interaktionsverhalten zu untersuchen, wurde GvpL und GvpM sowohl N- als auch C-terminal mit dem N- bzw. CGFP-Fragment fusioniert. Dazu wurde der *gvpL*- bzw. *gvpM*-Leserahmen mit den in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten synthetischen Oligonukleotiden mit Hilfe der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 amplifiziert und über die zuvor erwähnten Schnittstellen in die split-GFP Vektoren inseriert. Daraus resultierten die Plasmide pM x pJAS-NGFP-Nterm (nM), pM x pJAS-NGFP-Cterm (mN), pM x pWL-CGFP-Nterm (cM), pM x pWL-CGFP-Cterm (Mc), pL x pJAS-NGFP-Nterm (nL), pL x pJAS-NGFP-Cterm (Ln), pL x pWL-CGFP-Nterm (cL) und pL x pWL-CGFP-Cterm (Lc). Zur Vereinfachung wird im Laufe dieser Arbeit ausschließlich die in Klammern dargestellte Nomenklatur verwendet. Damit die GFP-Fragmente erfolgreich assemblieren können, muss *Hfx. volcanii* WR340 jeweils mit einem Plasmid, das den *ngfp*-Leserahmen und einem Plasmid, das den *cgfp*-Leserahmen trägt, transformiert werden. Daraus ergeben sich folgende Kombinationsmöglichkeiten: nM/Lc, nM/cL, mN/Lc, mN/cL, cM/Ln, cM/nL, Mc/Ln und Mc/nL. Um sicherstellen zu können, dass eine detektierte Fluoreszenz auf die Protein-Protein Interaktion der zu untersuchenden Gasvesikelproteine zurückzuführen ist, wurden zusätzlich die Transformanten N-/C-, N/C-, -N/C und -N/C- hergestellt, die die leeren GFP-Vektoren besitzen, ohne inserierten *gvp*-Leserahmen, aber mit den Genen für das C- oder N-terminale GFP-Fragment. Zur Detektion der Fluoreszenz wurden die Zellen in schwarze Mikrotiterplatten überführt und mit Basalsalz auf eine optische Dichte von 1 eingestellt. Die Fluoreszenz wird als relative Fluoreszenz (rf) angegeben und resultiert aus den normierten LAU/mm²-Werten (Abschnitt 4.4.12).

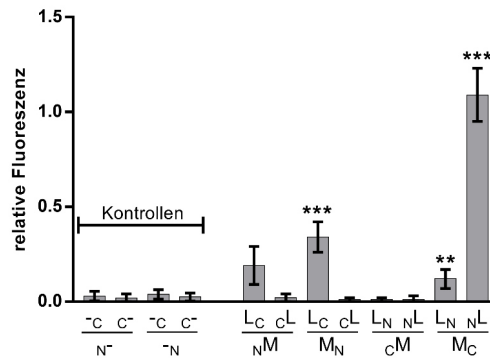


Abbildung 16: Untersuchung der L/M-Interaktion und der Negativkontrollen bei 37 °C. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Kontrollen: Relative Fluoreszenz von Transformanten, die die "leeren" Vektoren enthalten (tragen die *ngfp*- und *cgfp*-, aber keinen *gvp*-Leserahmen). Zusätzlich werden die rf-Werte der acht L/M-N/CGFP-Transformanten angezeigt. Die Gvp-Proteine, die mit NGFP oder CGFP fusioniert sind, sind unten in jedem Diagramm angegeben. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Signifikanz wurde durch den Student'schen t-Test bestimmt. Signifikant verschieden von dem nicht transformierten WR340, *** P < 0,001. ** P < 0.01

Wie erwartet konnte keine signifikante Fluoreszenz der Negativkontrollen festgestellt werden (Abbildung 16, Kontrollen). Somit kann eine festgestellte Fluoreszenz auf die Protein-Protein Interaktion der zu untersuchenden Proteine zurückgeführt werden. In der Untersuchung der verschiedenen L/M-Transformanten konnten deutlich unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden (Abbildung 16). Es zeigten ausschließlich die Doppeltransformanten M_N/L_C (rf = 0,34), M_C/L_N (rf = 0,12) und M_C/N_L (rf = 1,09) eine signifikant erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zum untransformierten *Hfx. volcanii* WR340. Mit einem maximalen rf-Wert von 1,09 waren diese jedoch sehr niedrig. Die restlichen Transformanten wiesen keine Fluoreszenz auf. Somit scheint die Fusionsposition der GFP-Fragmente eine wichtige Rolle bei der L/M-Interaktion zu spielen. Auffällig ist auch, dass die N-terminale Fusionierung von GvpM mit einem der GFP-Fragmente in keinem Fall zu fluoreszierenden Zellen führt. Bei einer C-terminalen Fusionierung von GvpM kommt es jedoch in drei von vier Fällen zu fluoreszierenden Transformanten (Abbildung 16). Dies deutet darauf hin, dass das C-terminale Ende von GvpM keine Relevanz für die L/M-Interaktion hat.

Darüber hinaus wurden von allen Transformanten Western-Analysen durchgeführt, um nachzuweisen, ob die Fusionsproteine von den Zellen korrekt synthetisiert werden (Abbildung 17). Die Western-Analysen der Fusionsproteine N_M bzw. M_N und M_C inkubiert mit einem GvpM-Antiserum zeigten wie erwartet die gesuchten Proteingrößen (Abbildung 17A). Entgegen der Erwartung konnte jedoch keine Proteingröße von c_M detektiert werden (Abbildung 17A). Folglich konnte c_M nicht korrekt von den Zellen synthetisiert werden. Dies könnte die fehlende Fluoreszenz der c_M/L_N - und c_M/N_L -Transformanten erklären. In den Western-Analysen inkubiert mit einem GvpL-Antiserum konnte N_L bzw. L_N wie erwartet detektiert werden (Abbildung 17B). Die Fusionsproteine c_L bzw. L_C konnten wider Erwarten nicht eindeutig detektiert werden, da sich auf der Höhe der erwarteten Proteingröße (49 kDa) unspezifische Proteinbanden befinden (Abbildung 17B). Da die Transformanten N_M/L_C bzw. M_N/L_C eindeutig fluoreszieren liegt eine korrekte Synthese von L_C nahe (Abbildung 16). Die Synthese von c_L bleibt jedoch fraglich.

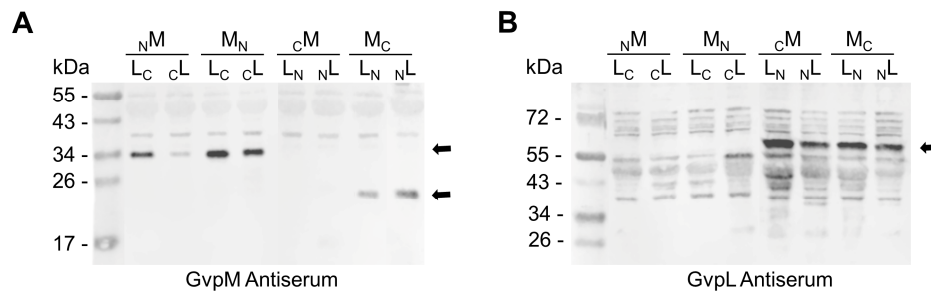


Abbildung 17: Western-Analyse der L/M-N/CGFP-Transformanten. Es wurden jeweils 20 µg des Gesamtzelllysates einer *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten auf eine SDS-PAGE aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den unter den Blots dargestellt Gvp-Antiseren inkubiert. Zur Visualisierung der gesuchten Proteine wurde der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper IRDye 800CW (Licor) verwendet, der im Nah-Infrarotbereich (800 nm) angeregt werden kann. Die Pfeile markieren die erwarteten Proteingrößen. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert.

5.3.2. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit

Es ist bereits bekannt, dass sich das Wildtyp-GFP bei Temperaturen über 25 °C ineffizient faltet, was zu großen Mengen an unlöslichem Protein führt (Scholz *et al.*, 2000). Daher wurden in unzähligen Studien GFP-Varianten hergestellt, die die Thermostabilität und die Löslichkeit des Proteins bei erhöhten Temperaturen von über 37 °C begünstigen. Beispielsweise erhöht die dreifach-Mutation F99S, M153T und V163A die Faltungseffizienz bei 37 °C 16-fach in *E. coli* (Crameri *et al.*, 1996). Um die Löslichkeit und die Thermostabilität in Haloarchaea zu verbessern, wurden zusätzlich die Mutationen S65T und Q80R eingefügt (mGFP) (Reuter and Maupin-Furlow, 2004). In haloarchaealen Promotorstudien von schwachen Gasvesikelpromotoren wurde jedoch festgestellt, dass die Fluoreszenz des mGFPs bei 42 °C nur knapp über der Autofluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 liegt, verursacht durch das Vorhandensein von Carotinoiden (Born and Pfeifer, 2019). Durch die zusätzliche Mutation F64L resultierte die GFP-Variante mGFP2, die eine 2,5-fach erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem mGFP bei 42 °C in *Hfx. volcanii* zeigte (Born and Pfeifer, 2019) und in dieser Arbeit zur Herstellung des split-GFP verwendet wurde. Um zu untersuchen, ob das split-GFP temperatur- und/oder wachstumsphasenabhängig ist, wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst wurden alle Transformanten für 24 h bei 37 °C inkubiert, bis eine optische Dichte von 1 erreicht wurde. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen, wie in Abschnitt 4.4.12 beschrieben, untersucht. In Versuchsreihe zwei und drei wurden die Transformanten für weitere 24 h bei 37 °C bzw. für weitere 24 h bei 30 °C inkubiert, bis diese eine optische Dichte von 1,5 bzw. 2 erreicht haben. Das Herabsenken der Temperatur sollte die Faltungseffizienz des GFPs begünstigen. Die Fluoreszenz aller Transformanten wurde schließlich miteinander verglichen (Abbildung 18).

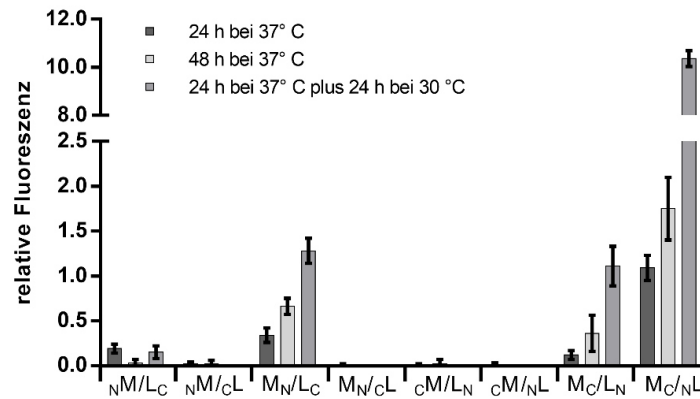


Abbildung 18: Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der split-GFP Methode. Die Doppeltransformanten, die die fusionierten *gvpL*- und *gvpM*-Leserahmen exprimieren, wurden jeweils für 24 h bei 37 °C inkubiert ($OD_{600nm} = 1$). Zusätzlich wurden die Transformanten für weitere 24 h bei 37 °C ($OD_{600nm} = 2$) bzw. für weitere 24 h bei 30 °C ($OD_{600nm} = 1,5$) inkubiert. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² gemessen und die relative Fluoreszenz im Vergleich zum untransformierten *Hfx. volcanii* WR340 ermittelt. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt.

Die Untersuchungen ergaben eine 1,6- bis 3-fach erhöhte Fluoreszenz der Transformanten, die für 48 h bei 37 °C inkubiert wurden, gegenüber den anfänglich gemessenen Transformanten, die für 24 h bei 37 °C inkubiert wurden (Abbildung 18). Der zusätzliche Inkubationsschritt von 24 h bei 30 °C erhöhte die Fluoreszenz der Transformanten gegenüber denen, die für 24 h bei 37 °C inkubiert wurden, bis zu 9,5-fach. Somit zeigte sich die Fluoreszenz sowohl wachstumsphasen- als auch temperaturabhängig. Das Herabsenken der Temperatur wirkte sich jedoch am positivsten auf die Fluoreszenz aus, weshalb für den weiteren Verlauf der Protein-Protein Interaktionsstudien die Transformanten zunächst für 24 h bei 37 °C, bis zu einer optischen Dichte von 1, und anschließend für weitere 24 h bei 30 °C auf eine optische Dichte von 1,5 inkubiert werden.

Anschließend wurden die Transformanten, die für 24 h bei 37 °C und zusätzlich 24 h bei 30 °C inkubiert wurden, mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskopes (CLSM) auf Fluoreszenz untersucht. Die CLSM-Aufnahmen zeigten eine verteilte Fluoreszenz innerhalb der M_C/N_L-Transformanten, die Transformanten M_N/L_C und M_C/L_N zeigten hingegen einzelne fluoreszierende Punkte innerhalb der Zellen (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu konnte keine Fluoreszenz in den Transformanten N_M/L_C, N_M/C_L, M_N/C_L, C_M/L_N und C_M/N_L identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen (Abbildung 18).

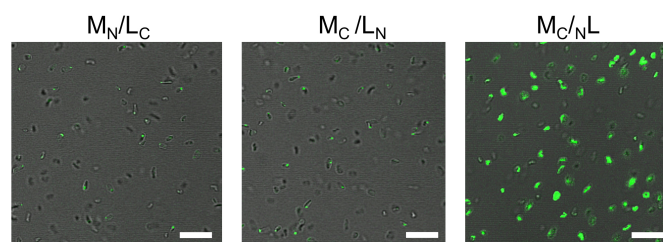


Abbildung 19: CLSM-Aufnahmen der M/L-N/CGFP-Transformanten. Gezeigt sind ausschließlich die Transformanten, die eine signifikante Fluoreszenz in den Fluoreszenzmessungen zeigten. Die Fusionskombination ist über den jeweiligen Aufnahmen angegeben. Der Maßstab ist 10 µm.

5.3.3. Untersuchungen der Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteinen mittels split-GFP

In den Untersuchungen der Protein-Protein Interaktionen mittels Affinitätschromatografie und Western-Analysen konnten bereits einige Interaktionen identifiziert und verifiziert werden (Abschnitt 5.2.2). Jedoch barg die Verwendung der unspezifischen Gvp-Antiseren in den Western-Analysen zur Identifizierung einzelner Interaktionspartner einige Schwierigkeiten. Somit konnten einzelne Interaktionen nicht eindeutig identifiziert werden. Zudem konnten mit den Western-Analysen nur qualitative Aussagen über mögliche Interaktionen getroffen werden. Interessant ist es jedoch auch die Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteine (relativ) zu quantifizieren. Für diese Untersuchungen und zur Verifizierung der in Abschnitt 5.2.2 erzielten Ergebnisse eignet sich die in dieser Arbeit etablierte split-GFP Methode. Dazu wurden alle Leserahmen der akzessorischen Gasvesikelproteine in die split-GFP Vektoren über die in Abschnitt 5.3.1 erwähnten Schnittstellen inseriert und *Hfx. volcanii* WR340 mit den resultierenden Plasmiden transformiert. Die Fluoreszenz der Transformanten wurde wie in Abschnitt 4.4.12 beschrieben untersucht.

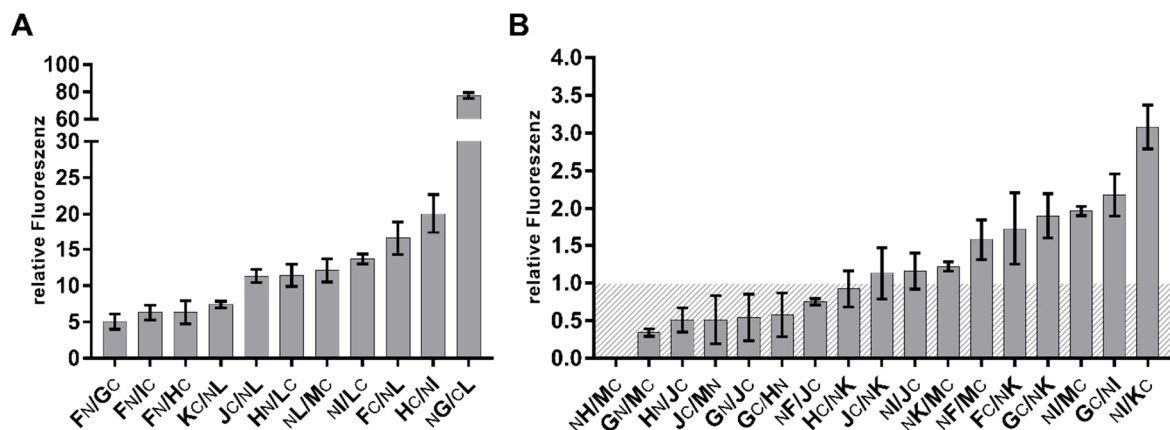


Abbildung 20: Interaktion von allen akzessorischen Gasvesikelproteinen. Dargestellt ist die Kombination, die die höchste Fluoreszenz zeigte. **A** Transformanten, die eindeutig eine Interaktion zeigten ($rf > 5$). **B** Transformanten, die keine ($rf < 1$) oder nur schwache Interaktionen zeigten (rf 1-5). Die Interaktionsschwelle ist durch den schraffierten Bereich dargestellt. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340-Zellen berechnet. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt.

Auf Grund der durchgeführten Fluoreszenz-Analysen konnten die untersuchten Transformanten in drei Gruppen kategorisiert werden: keine Interaktion ($rf < 1$), schwache Interaktion (rf 1-5) und eindeutige Interaktion ($rf > 5$) (Abbildung 20). Eine eindeutige Interaktion zeigte sich bei allen Transformanten, die GvpL synthetisieren. Die Transformante NG/CL fluoreszierte mit einem rf-Wert von 77,45 am stärksten (Abbildung 20A). Auch die Transformanten KC/NL, JC/NL, HN/LC, NL/MC, NI/LC und FC/NL zeigten deutliche Fluoreszenzsignale (Abbildung 20A). Als ähnlich starker Interaktionspartner erwies sich GvpF, das strukturelle Ähnlichkeiten zu GvpL besitzt (Winter *et al.*, 2018). Neben der Transformante FC/NL ($rf = 16,62$), fluoreszierten die Transformanten FN/GC ($rf = 5,07$), FN/IC ($rf = 6,3$) und FN/HC ($rf = 6,35$) deutlich (Abbildung 20A). Auffällig ist, dass das stärkste Fluoreszenzsignal

ausschließlich mit C-terminal fusioniertem GvpF erzielt werden kann. Ein weiteres starkes Fluoreszenzsignal zeigte die Transformante H_C/N_L (rf = 20,04) (Abbildung 20A). Eine schwache Interaktion konnte mit den Transformanten J_C/N_K, N_L/J_C, N_K/M_C, N_F/M_C, F_C/N_K, G_C/N_K, N_L/M_C, G_C/N_L und N_L/K_C identifiziert werden (Abbildung 20B). Diese zeigten mittlere rf-Werte von ca. 1 bis 3. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung schwanken die rf-Werte der Transformanten von J_C/N_K ($1,13 \pm 0,34$) und N_L/J_C ($1,16 \pm 0,24$) um den Schwellenwert (Abbildung 20B). Zu den Transformanten mit nicht-interagierenden split-GFP-Proteinen zählen die Transformanten N_H/M_C, G_N/M_C, H_N/J_C, J_C/M_N, G_N/J_C, G_C/H_N, N_F/J_C und H_C/N_K (Abbildung 20B). Diese Daten sind im Überblick in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung aller untersuchten Transformanten. In Klammern sind die rf-Werte der Transformanten angegeben, die jeweils die höchste Fluoreszenz zeigten. Die Interaktionspartner sind absteigend ihrer rf-Werte angegeben. In schwarzer Schrift sind die Interaktionspartner dargestellt, die stark interagieren (rf-Wert > 5) und in grau diejenigen Interaktionspartner, die nicht oder nur schwach interagieren (rf-Wert < 5).

GvpF	GvpL (16,62)	GvpH (6,35)	GvpI (6,30)	GvpG (5,07)	GvpK (1,73)	GvpM (1,58)	GvpJ (0,75)
GvpG	GvpL (77,45)	GvpF (5,07)	GvpI (2,18)	GvpK (1,90)	GvpH (0,58)	GvpJ (0,54)	GvpM (0,34)
GvpH	GvpI (20,04)	GvpL (11,44)	GvpF (6,35)	GvpK (0,92)	GvpG (0,58)	GvpJ (0,51)	GvpM (0)
GvpI	GvpH (20,04)	GvpL (13,70)	GvpF (6,30)	GvpK (3,08)	GvpG (2,18)	GvpM (1,97)	GvpJ (1,16)
GvpJ	GvpL (11,35)	GvpI (1,16)	GvpK (1,13)	GvpF (0,75)	GvpG (0,54)	GvpH (0,51)	GvpM (0,51)
GvpK	GvpL (7,39)	GvpI (3,08)	GvpG (1,90)	GvpF (1,73)	GvpM (1,22)	GvpJ (1,13)	GvpH (0,92)
GvpL	GvpG (77,45)	GvpF (16,62)	GvpI (13,70)	GvpM (12,13)	GvpH (11,44)	GvpJ (11,35)	GvpK (7,39)
GvpM	GvpL (12,13)	GvpI (1,97)	GvpF (1,58)	GvpK (1,22)	GvpJ (0,51)	GvpG (0,34)	GvpH (0)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GvpL neben GvpF die meisten Interaktionspartner aufweist (Tabelle 5). Somit könnten diese beiden Proteine eine zentrale Rolle im Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine spielen.

5.3.4. Fragmentierung von GvpM und Untersuchung der Dimerisierung

In vorherigen Western-Analysen inkubiert mit einem GvpM-Antiserum konnten Proteingrößen gefunden werden, die auf das GvpM-Monomer, aber auch auf eine dimere Form von GvpM hindeuten (Tavlaridou *et al.*, 2013). Werden weitere Gasvesikelproteine, wie zum Beispiel GvpH, in der Zelle synthetisiert, ist ausschließlich die Proteingröße für das GvpM-Monomer in Western-Analysen zu erkennen (Tavlaridou

et al., 2013). Somit wurde vermutet, dass GvpM Dimere ausbilden kann, die jedoch in Anwesenheit anderer Gasvesikelproteine aufgelöst werden können (Tavlaridou *et al.*, 2013). Zudem handelt es sich bei GvpM um ein hydrophobes Protein, das vermutlich membranassoziiert ist. Vor allem die erste α -Helix, sowie der unstrukturierte Bereich zwischen den beiden β -Faltblattstrukturen, zeigen einen auffällig hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Abbildung 21B). Somit neigt es dazu ungerichtet Proteinaggregate auszubilden. Um zu untersuchen, ob GvpM tatsächlich Dimere bildet, die so stark verbunden sind, dass diese sogar in einer SDS-PAGE nicht aufgelöst werden können, wurde die M/M-Interaktion mittels der split-GFP Methode untersucht. Dazu wurde GvpM sowohl N- als auch C-terminal mit den GFP-Fragmenten fusioniert und die daraus resultierenden vier Transformanten wie bereits beschrieben untersucht (Abschnitt 4.4.12). Es konnte jedoch keine signifikante Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte mit Hilfe der split-GFP Methode nicht gezeigt werden, dass GvpM mit sich selbst interagieren kann. Es ist jedoch unklar, ob GvpM tatsächlich nicht mit sich interagiert, oder das Ausbleiben der Fluoreszenz darauf beruht, dass GvpM aufgrund seiner Hydrophobizität Proteinaggregate bildet, die die GFP-Fragmente an der Assemblierung hindern. Um dies zu untersuchen wurde GvpM fragmentiert und die verschiedenen, mittels PCR hergestellten Fragmente, in die split-GFP Vektoren inseriert (Abschnitt 5.3.1). Die Fragmente enthielten unterschiedliche strukturelle Bereiche von GvpM (Abbildung 21A). Das Fragment M(0-61) enthält die Aminosäuren 1 bis 61 und alle strukturellen Eigenschaften, bis auf die α -Helix 3, während das Fragment M(1-45) nur die α -Helix 1 und die beiden β -Faltblattstrukturen enthält. Die Fragmente M(25N) und M(25C) beinhalten nur die Aminosäuren 1 bis 25 (α -Helix 1 und *loop* 1) bzw. 60 bis 84 (α -Helix 3). Die beiden Fragmente M(22-48) und M(25-59) repräsentieren den hydrophoben mittleren Bereich von GvpM und beinhalten die beiden β -Faltblattstrukturen und den möglicherweise unstrukturierten Bereich dazwischen. Unterschiedlich ist, dass M(22-48) vollständig die beiden Motive GAV und RAAIA beinhaltet, die sich bisher als wichtige Aminosäuresequenzen erwiesen haben (Tavlaridou *et al.*, 2014) und M(25-59) enthält zusätzlich zu den postulierten β -Faltblättern vollständig die α -Helix 2. Die Fragmentierung hatte das Ziel, die Hydrophobizität von GvpM zu verringern und für Protein-Protein-Interaktionen wichtige Bereiche zu identifizieren. Es wurde untersucht, ob die erstellten Fragmente mit sich selbst interagieren können, oder ob sie eine Interaktion mit dem vollständigen GvpM eingehen können. In Abbildung 21C ist die relative Fluoreszenz der Transformanten dargestellt, die die höchste Fluoreszenz zeigten.

Mit den Transformanten, die die Fragmente M(1-61), M(1-45), M(25N) und M(22-48) synthetisieren, konnten weder bei der Untersuchung der Interaktion mit sich selbst, noch mit dem vollständigen GvpM signifikant fluoreszierenden Zellen detektiert werden (Abbildung 21C). Im Gegensatz dazu konnten mit den Transformanten M(25-59)_C/M_N und N M(25C)/M_C mittlere rf-Werte von 1,06 bzw. 1,54 erreicht werden (Abbildung 21C). Mit den Transformanten M(25-59)_C/N M(25-29) und N M(25C)/M(25C)_C konnten jedoch keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden (Abbildung 21C). Dies deutet darauf hin, dass eine mögliche Dimerisierung vermutlich über die α -Helix 3 und die β -Faltblätter erfolgt. Auffallend ist auch, dass in keiner der M(22-48)-Transformanten signifikante Fluoreszenzen gemessen werden konnten, während die Transformante M_N/M(25-59)_C eine deutliche Fluoreszenz zeigte (Abbildung 21C). Der einzige

Unterschied zwischen diesen Fragmenten ist, dass im Fragment M(25-59) die α -Helix 2 vollständig vorliegt. Somit scheint die α -Helix 2 eine Rolle in der GvpM-Dimerisierung zu spielen.

Da die Fragmente M(25-59) und M(25C) nur mit dem vollständigen GvpM interagieren können und nicht mit sich selbst, liegt die Vermutung nahe, dass GvpM über diese Bereiche Dimere bildet. Vermutlich interagiert die α -Helix 3 des ersten GvpM mit den β -Faltblättern und/oder der α -Helix 2 des zweiten GvpM. Um dies zu untersuchen wurde die Protein-Protein Interaktion von M(25-59) und M(25C) analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ergab jedoch keine signifikant fluoreszierenden Zellen (Daten nicht gezeigt).

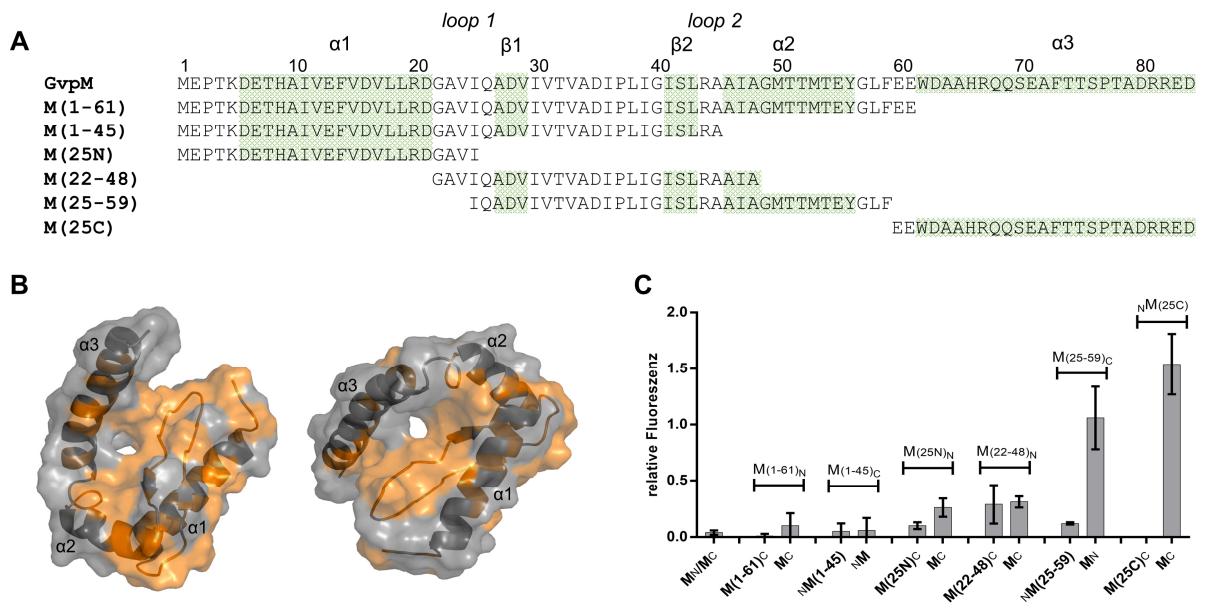


Abbildung 21: Untersuchung der GvpM-Fragmente. **A** Aminosäurealignment der einzelnen GvpM-Fragmente. Dargestellt ist die Sekundärstruktur in grün. **B** Homologiemodell von GvpM. Die hydrophobe Oberfläche ist in orange dargestellt. **C** Untersuchung der relativen Fluoreszenz der einzelnen Transformanten, die die GvpM-Fragmente synthetisieren. Dargestellt ist jeweils die Transformante, die die höchste Fluoreszenz zeigt. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt.

Zusammenfassend konnte eine Dimerisierung von GvpM mit Hilfe der split-GFP Methode nachgewiesen werden. Diese war mit einem maximalen mittleren rf-Wert von 1,54 sehr schwach. Zudem deutet es darauf hin, dass die letzten beiden α -Helices eine entscheidende Rolle bei der Dimerisierung spielt.

5.3.5. Bestimmung putativer Interaktionsstellen in GvpM mit anderen Gvp-Proteinen

Um mögliche Interaktionsstellen in GvpM mit den akzessorischen Gasvesikelproteinen näher zu definieren, wurden *in vivo* Protein-Protein Interaktionsstudien mit Hilfe der split-GFP Methode in Anwesenheit der GvpM-Fragmente M(25N), M(25-59) und M(25C) untersucht. Diese Fragmente umfassen alle strukturellen Bereiche von GvpM (Abbildung 21A). Es wurden erneut alle acht möglichen

Fusionskombinationen in *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten untersucht. In Abbildung 22 sind jedoch nur die Transformanten dargestellt, die die höchste Fluoreszenz zeigten. Mit Transformanten, die das Fragment M(25-59) in Anwesenheit der untersuchten akzessorischen Gasvesikelproteine synthetisieren, konnten in keinem Fall fluoreszierende Zellen beobachtet werden, weshalb diese in Abbildung 22 nicht berücksichtigt wurden.

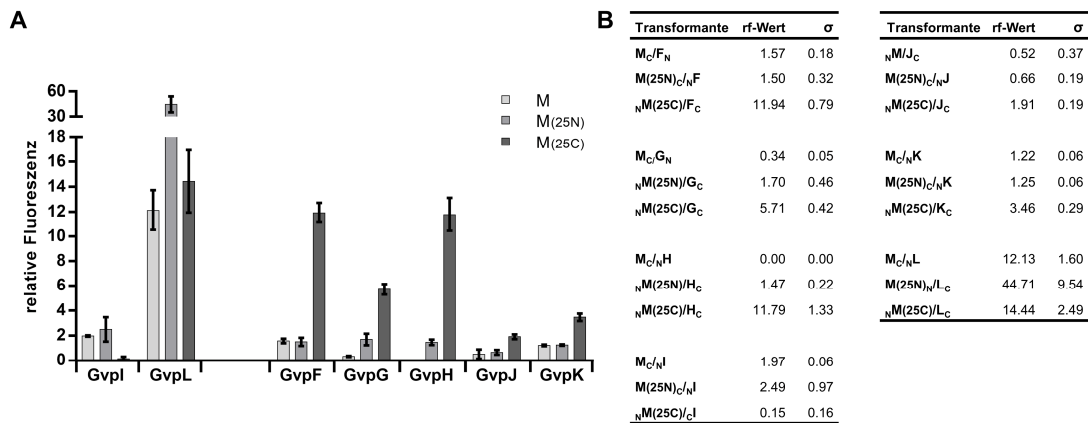


Abbildung 22: Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF bis GvpL mit GvpM und den Fragmenten M(25N) und M(25C). **A** Grafische Darstellung der rf-Werte der untersuchten Transformanten. Dargestellt sind jeweils die rf-Werte der Transformanten, die die höchste Fluoreszenz zeigten. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz (rf) im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. **B** Tabellarische Auflistung der rf-Werte und der Standardabweichungen (σ) der untersuchten Transformanten.

Die Untersuchung der Fluoreszenz der Transformante $M(25N)_C/NL$ ergab einen rf-Wert äquivalent zur Transformante M_C/NL (Abbildung 22). Demgegenüber konnte mit dem Fragment M(25C) und GvpI in keiner Kombination eine signifikante Fluoreszenz ermittelt werden (Abbildung 22). Folglich ist die Interaktionsstelle von GvpM und GvpI in der α -Helix 1 von GvpM lokalisiert. In der Untersuchung der Interaktion von GvpL mit den GvpM-Fragmenten konnte keine signifikante Veränderung der Fluoreszenz der Transformante $_NM(25C)/L_C$ gegenüber der Transformante M_C/NL festgestellt werden (Abbildung 22). In Anwesenheit des N-terminalen Fragmentes M(25N) (Transformante $M(25N)_C/NL$) erhöhte sich die Fluoreszenz jedoch um das 3,6-Fache im Vergleich zur Transformanten M_C/NL (Abbildung 22). Offenbar ist die Hauptinteraktionsstelle von GvpM und GvpL in der α -Helix 1 von GvpM lokalisiert, weitere Interaktionsstellen können sich jedoch auch in der α -Helix 3 von GvpM befinden.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Interaktion der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, GvpG, GvpH, GvpJ und GvpK mit diesen GvpM-Fragmenten. Mit der Transformante $M(25N)_C/NF$ wurden rf-Werte äquivalent zur Transformanten M_C/F_N ermittelt (Abbildung 22). Die Transformante $_NM(25C)/F_C$ zeigte jedoch eine 8-fach erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zur Transformanten M_C/F_N (Abbildung 22). Ein ähnliches Ergebnis wurde in den Untersuchungen der Interaktion von GvpJ und GvpK mit den verschiedenen GvpM-Fragmenten ermittelt. Mit den Transformanten $M(25N)_C/NJ$ und $_NM/J_C$ wurden äquivalente rf-Werte ermittelt, sowie mit den Transformanten $M(25N)_C/NK$ und M_C/NK (Abbildung 22). In Anwesenheit des C-terminalen Fragmentes von GvpM erhöhte sich die Fluoreszenz jedoch um das 2,8- bis 3,7-fache im Vergleich zum vollständigen GvpM (Abbildung 22). Mit den Transformanten M_C/G_N und M_C/NH konnten keine

Fluoreszenzwerte detektiert werden. Synthetisierten die Transformanten jedoch die Fragmente M(25N) bzw. M(25C) konnten rf-Werte von bis zu 12 ermittelt werden. Die Transformante $_{NM(25C)/G_C}$ fluoreszierte 3,4-fach stärker als die Transformante $_{NM(25N)/G_C}$ (Abbildung 22). Analog hierzu zeigte die Transformante $_{NM(25C)/H_C}$ 7-fach höhere rf-Werte als die Transformante $_{NM(25N)/H_C}$ (Abbildung 22). Folglich ist die Hauptinteraktionsstelle der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF, GvpG, GvpH, GvpJ bzw. GvpK mit GvpM in dessen α -Helix 3 lokalisiert. Weitere Interaktionsstellen werden jedoch zusätzlich in α -Helix 1 von GvpM vermutet. Hinsichtlich der Gasvesikelproteine GvpG und GvpH konnte einzig eine Interaktion mit den Fragmenten M(25N) und M(25C) identifiziert werden. Eine Interaktion mit dem vollständigen GvpM war nicht möglich. Es ist fraglich, ob GvpG und GvpH naturgemäß mit GvpM interagieren, oder ob die fehlende Fluoreszenz durch die Hydrophobizität und der damit einhergehenden Aggregationsneigung von GvpM bedingt ist.

Zusammenfassend konnten mögliche Interaktionsstellen in GvpM, an denen die akzessorischen Gasvesikelproteinen binden können, determiniert werden. Möglicherweise interagieren GvpL und GvpM während der Gasvesikelbildung und bilden einen Teil des putativen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine, da sie mit Abstand die stärkste Interaktion sowohl mit dem vollständigen GvpM als auch mit dem N-terminalen Fragment eingehen. Die Affinität von GvpI zu GvpM ist im Vergleich zu GvpL sehr schwach. Eine Steigerung der Fluoreszenz mit dem N-terminalen Fragment war nicht möglich. Sollte GvpI Teil des putativen Proteinkomplexes sein, ist es unwahrscheinlich, dass GvpM und GvpI interagieren. Die Gasvesikelproteine GvpF, GvpG, GvpH und GvpK interagierten ebenfalls nur sehr schwach bis gar nicht mit dem vollständigen GvpM. Eine eindeutige Fluoreszenz konnte lediglich mit dem C-terminalen Fragment von GvpM erzielt werden. Aus der Studie von Winter *et al.*, 2018 geht hervor, dass der C-terminale Bereich (die letzten 25 aa) von GvpM nicht relevant für die Gasvesikelbildung ist. Daher ist es fraglich, ob die Gasvesikelproteine GvpF, GvpG, GvpH und GvpK während der Gasvesikelbildung mit GvpM interagieren. Die erzielte Fluoreszenz in Anwesenheit des C-terminalen GvpM-Fragmentes ist womöglich auf die biochemischen Eigenschaften der α -Helix 3 zurückzuführen. Diese besteht zu etwa 26 % aus negativ geladenen Aminosäureresten und zeigt sich demnach äußerst reaktiv.

5.3.6. Untersuchung der Interaktion von GvpM mit anderen akzessorischen Gvps in Anwesenheit von GvpH

Das akzessorische Gasvesikelprotein GvpH ist ca. 20 kDa und nicht essentiell für die Bildung eines gasgefüllten Vesikels (Offner *et al.*, 2000). Dennoch wirkt sich dessen Anwesenheit positiv auf die Stabilität der Gasvesikel aus. Zudem hält es hydrophobe Gasvesikelproteine wie GvpJ und GvpM in Lösung (Tavlaridou *et al.*, 2014). Darüber hinaus kann dieses Protein in geringen Mengen in Gasvesikelpräparationen sowohl immunologisch als auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Shukla and DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Aus diesen Gründen wurde vermutet, dass GvpH womöglich als Helferprotein/Chaperon während der GV-Bildung fungiert. Zur Erforschung des Einflusses der Anwesenheit von GvpH auf die Interaktionen von GvpM mit GvpF, GvpG, GvpI, GvpJ,

GvpK und GvpL wurden zunächst zwei *shuttle*-Vektoren hergestellt (Abbildung 23A). Diese sind Derivate der *shuttle*-Vektoren pJAS-NGFP-Nterm und pJAS-NGFP-Cterm. Die Expression der split-GFP-fusionierten Leserahmen steht unter der Kontrolle des P_{fdx} -Promotors und die der zusätzlich exprimierten *gvp*-Leserahmen unter der Kontrolle des starken P_2 -Promotors. Die Leserichtungen der beiden Genregionen sind entgegengesetzt orientiert. Durch die zusätzliche *cloning site* wird der *ngfp*-fusionierte *gvp*-Leserahmen *in cis* mit dem *gvp*-Leserahmen exprimiert. Die zusätzlichen *gvp*-Leserahmen können über die Schnittstellen *HindIII* und *SpeI* in die Vektoren inseriert werden (Abbildung 23A). Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Transformanten ist der Abbildung 23B zu entnehmen.

Die Untersuchungen ergaben tendenziell geringere rf-Werte in Anwesenheit von GvpH und + ΔX (alle akzessorischen Gasvesikelproteine bis auf GvpX; X = GvpF, GvpG, GvpI, GvpJ, GvpK, GvpL) im Vergleich zu den NX/M_C -Transformanten (Abbildung 23C). Besonders hervorzuheben ist die Untersuchung der Interaktion von NL/M_C in Anwesenheit von GvpH und der anderen akzessorischen Gasvesikelproteine F- ΔL . Die Anwesenheit von GvpH führte zu einer Reduktion der relativen Fluoreszenz auf 24 % im Vergleich zur NL/M_C -Transformanten (Abbildung 23C). Die Anwesenheit der akzessorischen Gasvesikelproteine F- ΔL erhöhte die Fluoreszenz auf etwa die Hälfte der Ursprungsfluoreszenz (NL/M_C -Transformante; Abbildung 23C). Somit hat die Anwesenheit von GvpH einen negativen Effekt auf die Fluoreszenz der L/M-Interaktion, welcher jedoch durch die Anwesenheit anderer akzessorischer Gasvesikelproteine teilweise kompensiert werden kann.

Mit den Transformanten, die NF/M_C , NI/M_C bzw. NK/M_C *in trans* synthetisieren, konnten rf-Werte ermittelt werden, die knapp über 1 bzw. 2 liegen (Abbildung 23C) und somit als schwache Interaktionen zählen (Abschnitt 5.3.3). Die Anwesenheit von GvpH oder der anderen akzessorischen Gasvesikelproteine reduzierte diese Werte auf 0 bis 0,5. Die Untersuchung der Transformante F- $\Delta K+NK/M_C$ konnte nicht durchgeführt werden, da das Konstrukt F- $\Delta K+NK$ nicht hergestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Sicher ist jedoch, dass sich auch hier die Anwesenheit von GvpH negativ auf die ohnehin schwache K/M-Interaktion auswirkt.

Mit den Transformanten, die NG/M_C bzw. NJ/M_C *in trans* synthetisieren, konnte weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von GvpH oder der anderen akzessorischen Gasvesikelproteine (F- ΔG bzw. F- ΔJ) eine signifikante Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 23C). Lediglich mit den Transformanten NG/M_C bzw. $\Delta G+NG/M_C$ konnten rf-Werte von ca. 0,5 ermittelt werden, die jedoch unterhalb des Schwellenwertes liegen, der eine Interaktion anzeigt (Abschnitt 5.3.3).

Zusammenfassend besitzt GvpH einen negativen Einfluss auf die Interaktion von GvpM mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen, welcher durch die Anwesenheit der anderen akzessorischen Gasvesikelproteine nicht oder nur teilweise kompensiert werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint eine L/M-Interaktion vor oder während der Gasvesikelbildung wahrscheinlich, während eine Interaktion von GvpF, GvpG, GvpI, GvpJ und GvpK mit GvpM eher unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus scheinen sich die verschiedenen Gasvesikelproteine gegenseitig im Interaktionsverhalten zu beeinflussen. Diese Ergebnisse verifizieren die in Abschnitt 5.3.3 erzielten Ergebnisse und unterstreichen die Komplexität des Interaktionsnetzwerkes der akzessorischen Gasvesikelproteine bei der Gasvesikelbildung.

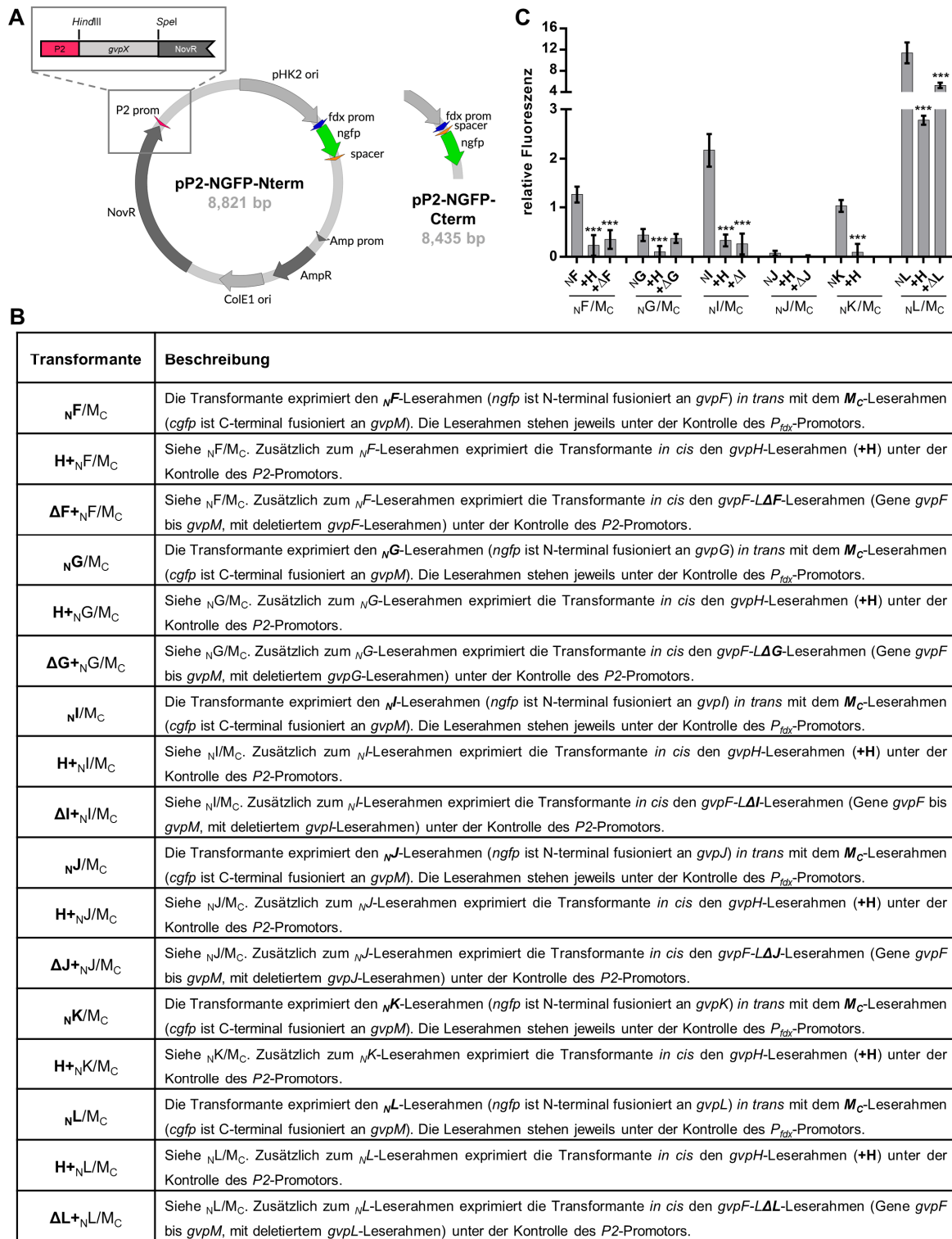


Abbildung 23: Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion von GvpM mit akzessorischen Gasvesikelproteinen
A Vektorkarte der *shuttle*-Vektoren pP2-NGFP-Nterm und pP2-NGFP-Cterm. Die Expression der split-GFP-fusionierten Leserahmen steht unter der Kontrolle des P_{fdx} -Promotors (*fdx* prom) und die der zusätzlich exprimierten *gvp*-Leserahmen unter der Kontrolle des P_2 -Promotors (P_2 prom). Die Leserichtungen der beiden Genregionen sind entgegengesetzt orientiert.
B Tabellarische Erläuterung der untersuchten *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten
C Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion aller N^X/M_C -Transformanten in Anwesenheit von GvpH bzw. anderer akzessorischer Gasvesikelproteine. $H+N^X/M_C$ -Transformanten sind mit +H abgekürzt. $F-\Delta X+N^X/M_C$ -Transformanten sind mit ΔX abgekürzt. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Signifikanz wurde durch den Student'schen t-Test bestimmt. Signifikant verschieden von der jeweiligen Positivkontrolle (N^X/M_C), *** $P < 0,001$

Zusätzlich wurde der Einfluss von GvpH und anderer akzessorischer Gasvesikelproteine auf die M/M-Dimerisierung untersucht. Die Untersuchung erfolgte wie zuvor beschrieben. Dazu wurden folgende Transformanten hergestellt: $_{NM}/M_C$, $H+_{NM}/M_C$, $F-L+_{NM}/M_C$, $_{NM}/cM$, $H+_{NM}/cM$, $F-L+_{NM}/cM$, M_N/M_C , $H+M_N/M_C$, $F-L+M_N/M_C$, M_N/cM , $H+M_N/cM$ und $F-L+M_N/cM$. Bei keiner dieser Transformanten konnte eine Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Folglich scheint die dimere Form von GvpM keine Relevanz bei der Gasvesikelbildung zu besitzen.

5.3.7. Bestimmung der Interaktionspartner von GvpA

GvpA ist mit 8 kDa das kleinste Gasvesikelprotein, aber auch das Bedeutendste. Es ist essentiell für die Gasvesikelbildung und bildet hauptsächlich die Gasvesikelhülle aus. Durch Assemblierung von GvpA wird die charakteristische Rippenstruktur der Gasvesikelhülle ausgebildet, die als *low pitched* Helix senkrecht zur Längsachse des Gasvesikels verläuft (Offner *et al.*, 1998; Strunk *et al.*, 2011). Diese Rippenstruktur wird an der Außenseite durch das Strukturprotein GvpC stabilisiert (Offner *et al.*, 1996). GvpA besitzt Sequenzähnlichkeiten zu GvpJ und GvpM, weshalb diese Proteine vielleicht ebenfalls Strukturproteine sind. Die Kristallstruktur von GvpA ist bislang unbekannt. Durch *solid-state* NMR-Analysen und *high performance de novo modelling* konnte eine 3D-Struktur erstellt werden, die durch *in vivo* Mutagenesestudien mit $A_{mut}+\Delta A-Hfx. volcanii$ -Transformanten verifiziert wurde (Sivertsen *et al.*, 2010; Strunk *et al.*, 2011; Knitsch *et al.*, 2017). Dieses Modell sieht eine coil- α - β - α -coil Struktur vor (Abbildung 24A). Somit ist über den Aufbau der Gasvesikelhülle einiges bekannt. Unbekannt ist jedoch, wie der Beginn der Gasvesikelbildung verläuft. Vermutlich bilden die akzessorischen Gasvesikelproteine zu Beginn einen oder mehrere Komplexe, an dem GvpA assoziieren und über die Zeit einen reifen Gasvesikel ausbilden kann. Dabei ist es unklar, wie dieser Komplex zusammengesetzt ist und mit welchen oder welchem akzessorischen Gasvesikelprotein(en) GvpA interagiert. Um zu verstehen, wie dieser Komplex aussehen könnte, wurde mit Hilfe der split-GFP Methode die *in vivo* Protein-Protein Interaktionen von GvpA mit den akzessorischen Gasvesikelproteinen untersucht. Es wurden erneut alle acht Kombinationen untersucht und nur die Transformante mit der höchsten Fluoreszenz in Abbildung 24B dargestellt.

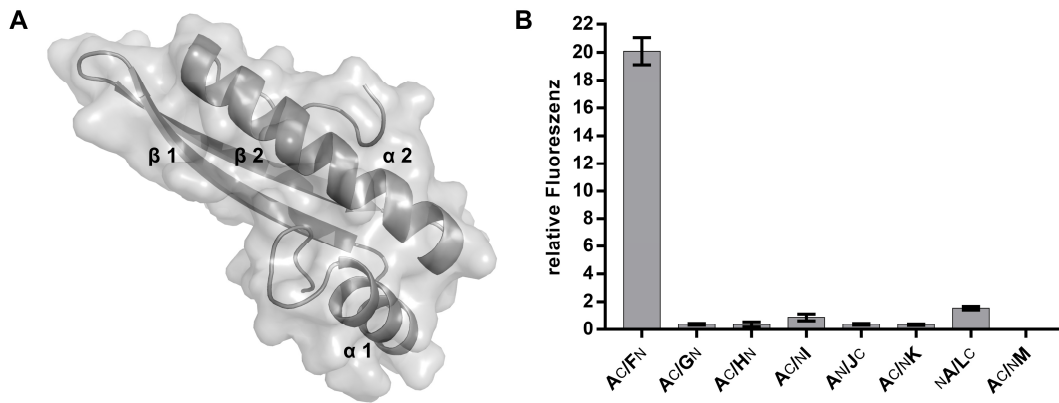


Abbildung 24: Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion von GvpA mit den akzessorischen Gasvesikelproteinen. **A** *in silico* Modell von GvpA nach Strunk *et al.*, 2011. **B** Relative Fluoreszenzwerte der Untersuchung der Protein-Protein Interaktion von GvpA mit den akzessorischen Gasvesikelproteinen. Dargestellt ist die Kombination, die die höchste Fluoreszenz zeigte. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz von untransformierten *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt.

Die Transformante A_C/F_N zeigte mit Abstand die höchste Fluoreszenz (rf = 20) im Vergleich zu den anderen untersuchten Transformanten (Abbildung 24B). Mit den Transformanten N_A/L_C und A_C/N_K wurden rf-Werte von ca. 1 ermittelt und die Transformanten A_C/G_N, A_C/H_N, A_N/J_C, A_C/N_K und A_C/M_N zeigten mit rf-Werten zwischen 0 und 0,5 keine signifikante Fluoreszenz (Abbildung 24B). Folglich interagiert GvpA ausschließlich mit GvpF. Eine Interaktion mit den anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen konnte nicht oder nur sehr schwach festgestellt werden. Möglicherweise ist GvpF der Verbindungspunkt zwischen GvpA und dem putativen Proteinkomplex der akzessorischen Gasvesikelproteine zu Beginn und/oder während der Gasvesikelbildung.

5.4. Mutagenesestudie von GvpM

5.4.1. Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion von GvpM-Deletionsvarianten mit GvpF und GvpL

Um die Interaktionsstelle von GvpF und GvpL mit GvpM näher zu bestimmen, wurden verschiedene GvpM-Deletionsvarianten mit Hilfe der split-GFP Methode untersucht. Die N-terminalen Deletionsvarianten M(Δ5N), M(Δ10N) und M(Δ20N) sowie die C-terminale Deletionsvariante M(Δ10C) wurden bereits auf Gasvesikelbildung in ΔM+M(mut)-Transformanten getestet (Tavlaridou *et al.*, 2014). Das Konstrukt ΔM enthält bis auf *gvpM* alle *gvp*-Leserahmen, und GvpM, das *in trans* synthetisiert wird, ergänzt ΔM zur Gasvesikelbildung in ΔM+M-Transformanten. ΔM+M(Δ5N)-Transformanten produzieren in einigen wenigen Fällen einen einzelnen Gasvesikel pro Zelle, während ΔM+M(Δ10N)- und ΔM+M(Δ20N)-Transformanten Vac-negativ sind, was die Bedeutung der N-terminalen Region von GvpM unterstreicht (Tavlaridou *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu führt eine 10-aa-Deletion am C-Terminus zu einem

Vac-positiven Phänotypen in $\Delta M + M(\Delta 10C)$ -Transformanten (Tavlaridou *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurden C-terminale Deletionen (bis zu 30 aa) hergestellt und auf Gasvesikelbildung untersucht. Western-Analysen zeigten, dass alle GvpM-Deletionsvarianten stabil und nachweisbar waren (Musillo, 2017). Mit Hilfe von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Transformanten $\Delta M + M(\Delta 15C)$ und $\Delta M + M(\Delta 20C)$ wie der Wildtyp viele Gasvesikel enthielten, während vereinzelt Zellen der Transformanten $\Delta M + M(\Delta 25C)$ maximal einen einzigen Gasvesikel besaßen, die meisten Zellen (> 80 %) jedoch Vac-negativ waren (Musillo, 2017; Winter *et al.*, 2018). Demgegenüber zeigten die Transformanten $\Delta M + M(\Delta 27C)$, $\Delta M + M(\Delta 29C)$ und $\Delta M + M(\Delta 30C)$ einen Vac-negativen Phänotypen (Musillo, 2017; Winter *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein großer Teil des C-terminalen Endes von GvpM einschließlich der putativen Helix $\alpha 3$ (aa 62-84) für die Gasvesikelbildung nicht erforderlich ist, während der N-terminale Bereich offenbar essentiell ist.

Alle oben genannten GvpM-Deletionsvarianten wurden in dieser Arbeit dazu verwendet, um die Interaktion mit GvpF bzw. GvpL in der Kombination $NF/M(mut)_C$ bzw. $NL/M(mut)_C$ zu testen, die die höchste GFP-Fluoreszenz in *Hfx. volcanii*-Transformanten zeigten. Die Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion von GvpF mit den N-terminalen GvpM-Deletionsvarianten ergab bei der 5-aa Deletion in

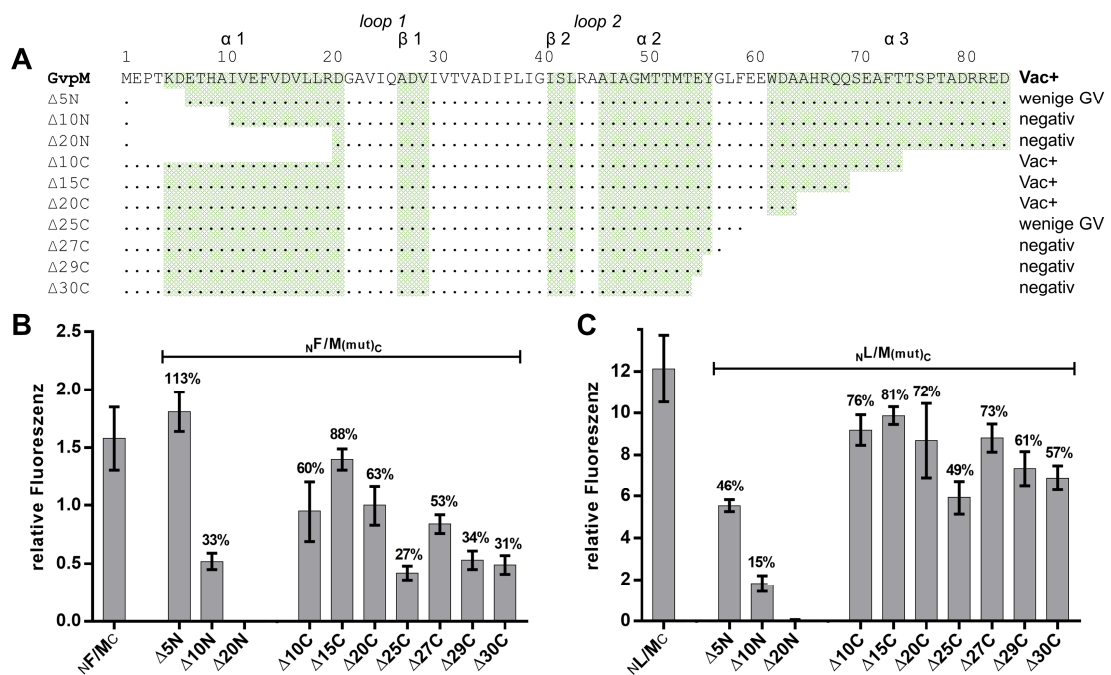


Abbildung 25: Untersuchung der *in vivo* Interaktion der akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF und GvpL mit GvpM-Deletionsvarianten mittels split-GFP. **A** GvpM-Deletionsvarianten und deren Vac-Phänotyp. Die aa-Sequenz von GvpM ist oben angegeben, einschließlich der sekundären Strukturelemente $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$, die grün hinterlegt sind. Die verschiedenen Deletionsvarianten sind unten dargestellt. Punkte beziehen sich auf identische Aminosäuren. Der mit den jeweiligen *Hfx. volcanii*-Transformanten beobachtete Vac-Phänotyp ist rechts angegeben. Negativ: Gasvesikel konnten nicht beobachtet werden; wenige GV: ein einziger Gasvesikel wurde in einigen Zellen gefunden, während viele Zellen (> 80 %) negativ waren; Vac+: vollständig gasvesikulierten Zellen. Die Deletionsvarianten $\Delta 5N$, $\Delta 10N$, $\Delta 20N$ und $\Delta 10C$ sind von Tavlaridou *et al.*, 2014 und die Deletionsvarianten $\Delta 20C$, $\Delta 25C$, $\Delta 27C$ und $\Delta 30C$ von Winter *et al.*, 2018 beschrieben. **B** *in vivo* Interaktionsstudie mit den GvpM-Deletionsvarianten und GvpF. **C** *in vivo* Interaktionsstudie mit den GvpM-Deletionsvarianten und GvpL. Dargestellt sind jeweils die rf-Werte der Transformanten, die die höchste Fluoreszenz zeigten. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mn² bestimmt und die relative Fluoreszenz (rf) im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Die angegebenen prozentualen Werte beziehen sich jeweils auf die Positivkontrolle (NF/M_C bzw. NL/M_C). Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt.

$\text{NF/M}(\Delta 5\text{N})_{\text{C}}$ -Transformanten keine signifikante Änderung der Fluoreszenz im Vergleich zur Positivkontrolle (NF/M_{C} ; Abbildung 25B). Mit $\text{NF/M}(\Delta 10\text{N})_{\text{C}}$ -Transformanten wurden stark reduzierte rf-Werte ermittelt (Abbildung 25B; 33 %) und eine Fluoreszenz in $\text{NF/M}(\Delta 20\text{N})_{\text{C}}$ -Transformanten war nicht detektierbar (Abbildung 25B). Folglich sind die ersten 5 Aminosäuren unbedeutend für die F/M-Interaktion. Alle $\text{NF/M}(\text{mut})_{\text{C}}$ -Transformanten, die die C-terminalen GvpM-Deletionsvarianten synthetisieren, zeigen reduzierte Fluoreszenzwerte von 63 bis 27 % im Vergleich zum Wildtyp-GvpM (Abbildung 25B). Eine Ausnahme bildete die Transformante $\text{NF/M}(\Delta 15\text{C})_{\text{C}}$, die ähnliche rf-Werte wie der Wildtyp aufwies (Abbildung 25B). Insgesamt unterstützten diese Ergebnisse die Hypothese, dass die F/M-Interaktion hauptsächlich im C-terminalen Teil von GvpM auftritt.

Die Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion von GvpL mit den GvpM-Deletionsvarianten zeigte, dass eine C-terminale Deletion von bis zu 27 Aminosäuren nur einen geringfügigen Effekt auf die L/M-Interaktion hat, da die Fluoreszenz der Transformanten $\text{NL/M}(\Delta 10\text{C})_{\text{C}}$ bis $\text{NL/M}(\Delta 27\text{C})_{\text{C}}$ im Vergleich zur Transformanten NL/M_{C} nur um 24-28 % reduziert ist (Abbildung 25C). Eine Ausnahme bildete hier die Transformante $\text{NL/M}(\Delta 25\text{C})_{\text{C}}$. Bei dieser Transformanten wurde eine reduzierte Fluoreszenz von etwa 50 % detektiert (Abbildung 25C). Möglicherweise weist die GvpM-Variante $\Delta 25\text{C}$ eine veränderte Konformation auf, die eine L/M-Interaktion erschwert. Die Transformanten $\text{NL/M}(\Delta 29\text{C})_{\text{C}}$ und $\text{NL/M}(\Delta 30\text{C})_{\text{C}}$ weisen dagegen nur noch 57 bis 61 % der Wildtyp-Fluoreszenz auf (Abbildung 25C). Die Reduktion der Fluoreszenz könnte auf die relativ große Deletion in GvpM zurückzuführen sein, die die Helix $\alpha 3$ und den Bereich zwischen $\alpha 2$ und $\alpha 3$ umfasst; dies könnte die GvpM-Struktur und auch die L/M-Interaktion beeinflussen. Die Untersuchung von Deletionsvarianten im N-terminalen Bereich ergab, dass die Transformanten $\text{NL/M}(\Delta 5\text{N})_{\text{C}}$ und $\text{NL/M}(\Delta 10\text{N})_{\text{C}}$ eine reduzierte Fluoreszenz von 46 bzw. 15 % im Vergleich zur Wildtyp-Fluoreszenz zeigten (Abbildung 25C). Die Transformante $\text{NL/M}(\Delta 20\text{N})_{\text{C}}$ zeigte dagegen keine fluoreszierenden Zellen (Abbildung 25C). Diese Ergebnisse und die Ergebnisse aus Abschnitt 5.3.1 bzw. 5.3.5 deuten darauf hin, dass der N-terminale Teil von GvpM eine entscheidende Rolle für die L/M-Interaktion spielt.

5.4.2. Untersuchung von GvpM-Varianten im Bereich der putativen α -Helix 1

Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der N-terminale Bereich von GvpM, und somit die α -Helix 1, sowohl für die Gasvesikelbildung als auch für die L/M-Interaktion eine wichtige Rolle spielt. Um mögliche Interaktionsstellen in GvpM zu GvpL näher definieren zu können, wurde in dieser Arbeit in den ersten 25 aa von GvpM Punktmutationen eingefügt und sowohl auf Gasvesikelbildung, als auch auf die L/M-Interaktion untersucht. In vergangenen Studien wurden bereits einzelne Mutationen in diesem Bereich eingeführt und die $\Delta\text{M}+\text{M}_{\text{mut}}$ -Transformanten im Hinblick auf Gasvesikelbildung untersucht (Tavlaridou *et al.*, 2014). Diese Transformanten exprimierten das Konstrukt $\Delta\text{M} \times \text{pWL102}$ (p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1 mit deletiertem *gvpM*-Leserahmen inseriert in den Vektor pWL102) und das Konstrukt $\text{pM}_{\text{mut}} \times \text{pJAS35}$ (mutierter *gvpM*-Leserahmen inseriert in den Vektor pJAS35) *in trans*. In diesen Studien zeigte sich, dass eine N-terminale Deletion von 5 Aminosäuren die Gasvesikelbildung negativ beeinflusst. Auch in Transformanten, die die GvpM-Varianten V15E, L19E,

G22D, A23D und V24D synthetisierten, konnten keine Gasvesikel festgestellt werden (Tavlaridou *et al.*, 2014). Die GvpM-Varianten E13A, D16A, R20A und D21A hatten hingegen keine Auswirkung auf die Gasvesikelbildung.

In diesem Versuchsteil wurden die ersten 25 Aminosäuren von GvpM, die bislang noch nicht untersucht waren, jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht. Die Aminosäuren wurden über Mutagenese-PCR unter der Verwendung entsprechender synthetischer Oligonukleotiden substituiert (Abschnitt 4.1.4). Das Konstrukt pM x pJAS35 wurde als Matrize verwendet. *Hfx. volcanii* WR340 wurde simultan mit pM_{mut} x pJAS35 und dem Konstrukt ΔM x pWL102 transformiert. Die Transformante ΔM+M_{L18A} konnte nicht hergestellt werden, weshalb sie im Weiteren nicht berücksichtigt wird.

Zur Untersuchung, ob die Transformanten das mutierte GvpM synthetisieren, wurden Western-Analysen durchgeführt (Abbildung 26). Es wurden 50 ml Zellen aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase entnommen, aufgeschlossen und jeweils 20 µg des Gesamtzelllysates mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die GvpM-Varianten mittels GvpM-Antiserums und einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert.

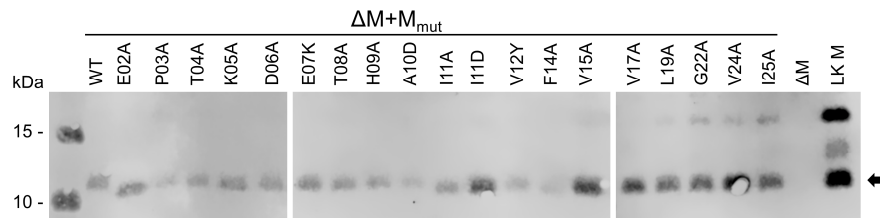


Abbildung 26: Western-Analyse der ΔM+M_{mut}-Transformanten. Es wurden jeweils 20 µg eines Gesamtzelllysates einer 50 ml Flüssigkultur aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase auf eine SDS-PAGE aufgetragen, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem GvpM-Antiserum inkubiert. Zusätzlich wurde als Ladekontrolle das Gesamtzelllysate einer *Hfx. volcanii*-Transformanten aufgetragen, die GvpM in Abwesenheit der restlichen Gasvesikelproteine synthetisierte (LK M). Zur Visualisierung der GvpM-Varianten wurde der Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper IRDye 800CW (Licor) verwendet, der im Nah-Infrarotbereich (800 nm) angeregt werden kann. Der Pfeil markiert das GvpM-Monomer. Die Blots wurden nach schwarz-weiß invertiert.

Wie erwartet konnte in der Western-Analyse der Positivkontrolle ΔM+M_{wt} das GvpM-Monomer (12 kDa) detektiert werden (Abbildung 26). In der Western-Analyse der Negativkontrolle ΔM konnte dagegen kein GvpM nachgewiesen werden, da diese Transformante die p-vac Region aus *Hbt. salinarum* ohne *gvpM*-Leserahmen exprimiert (Abbildung 26). Als Ladekontrolle (LK M) diente das Gesamtzelllysate einer *Hfx. volcanii*-Transformanten, die das Konstrukt pM x pJAS35 exprimiert. In der Western-Analyse der Ladekontrolle wurden sowohl das GvpM-Monomer als auch das Dimer detektiert (Abbildung 26). In den Western-Analysen der Transformanten, die die verschiedenen GvpM-Varianten in Anwesenheit des ΔM-Konstruktes synthetisieren, war das GvpM-Monomer in allen Fällen vorhanden (Abbildung 26). Somit konnte nachgewiesen werden, dass GvpM trotz der einzelnen Punktsubstitutionen gebildet wird und das Protein stabil ist. Nach 5-wöchiger Inkubation auf Festmedium wurden die Transformanten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf Gasvesikelbildung untersucht (Abbildung 27).

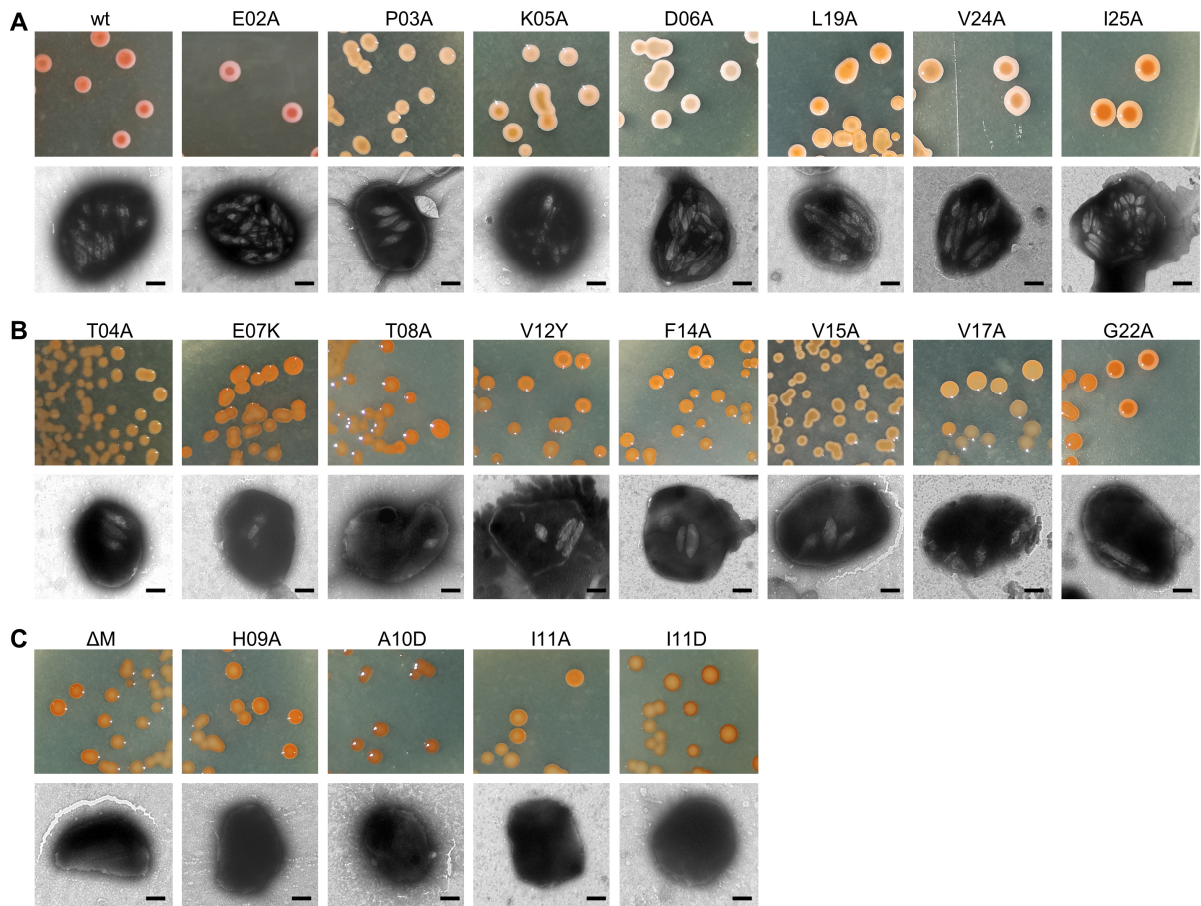


Abbildung 27: GvpM-Varianten und deren Einfluss auf die Gasvesikelbildung in *Hfx. volcanii*-Transformanten. Als Positivkontrolle diente die Transformante $\Delta M + M_{wt}$ (ΔM = p-vac Region mit deletiertem *gvpM*-Leserahmen; M_{wt} = unmutierter *gvpM*-Leserahmen). Als Negativkontrolle diente die Transformante ΔM , die ausschließlich die vac-Region mit deletiertem *gvpM*-Leserahmen beinhaltet. In oberer Reihe sind makroskopische Aufnahmen 5 Wochen alter Kolonien. Darunter sind representative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der $\Delta M + M_{mut}$ -Transformanten dargestellt. **A** GvpM-Varianten mit Vac^+ Phänotypen **B** GvpM-Varianten mit Vac^{+-} Phänotypen **C** GvpM-Varianten mit Vac^- Phänotypen. Der Maßstab der TEM-Aufnahmen ist jeweils 0,5 μm . Die Substitutionen sind jeweils über den Aufnahmen angegeben.

Die Kolonien der Positivkontrolle $\Delta M + M_{wt}$ waren wie erwartet rosafarben und trüb, was einen Vac -positiven Phänotypen anzeigt (Abbildung 27A). Dies konnte mit Hilfe von transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen bestätigt werden (Abbildung 27A). Darüber hinaus zeigte die Negativkontrolle ΔM , die ausschließlich die p-vac Region mit deletiertem *gvpM*-Leserahmen exprimiert, wie erwartet rote, durchscheinende Kolonien, die auf einen Vac -negativen Phänotypen hinweisen (Abbildung 27C). Auch in den TEM-Aufnahmen konnten keine Gasvesikel in den Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 27C).

Die Kolonien der Transformanten $\Delta M + M_{mut}$, die die GvpM-Varianten E02A, P03A, K05A, D06A, L19A, V24A und I25A synthetisieren, zeigen ähnlich zur Positivkontrolle eine rosa Färbung sowie eine Trübung (Abbildung 27A). Auch in der Betrachtung mittels TEM konnten mit Gasvesikeln gefüllte Zellen beobachtet werden, die sowohl mengenmäßig als auch morphologisch der Positivkontrolle ähneln (Abbildung 27A). Somit beeinflussen diese Substitutionen die Gasvesikelbildung nicht.

Die Kolonien der $\Delta M + M_{mut}$ -Transformanten, die die GvpM-Varianten T04A, E07K, T08A, V12Y, F14A, V15A, V17A und G22A synthetisieren, sind durchsichtig bis leicht trüb und rot gefärbt (Abbildung 27B). Mittels TEM konnte ein heterogener Vac-Phänotyp festgestellt werden (Abbildung 27B). Etwa 50 % der beobachteten Zellen besitzen 1-5 Gasvesikel, die restlichen 50 % sind Vac-negativ. Morphologisch zeigten sich die untersuchten Gasvesikel ähnlich der Positivkontrolle. In einigen Fällen jedoch konnten doppelt so lange Gasvesikel in den Zellen beobachtet werden (Abbildung 27B, V12Y und G22A). Diese Substitutionen wirken sich folglich stark negativ auf die Menge der gebildeten Gasvesikel aus. Teilweise haben sie auch einen Einfluss auf die Länge der Gasvesikel.

Die Kolonien der Transformanten $\Delta M + M_{mut}$, die die GvpM-Varianten H09A, A10D, I11A und I11D synthetisieren, sind rot gefärbt und durchsichtig, was einen Vac-negativen Phänotypen impliziert (Abbildung 27C). Auch in den TEM-Aufnahmen konnten keine Gasvesikel in den Zellen beobachtet werden (Abbildung 27C). Somit führt der Austausch dieser Aminosäuren zur Abwesenheit von Gasvesikeln in $\Delta M + M_{mut}$ -Transformanten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich Substitutionen im Bereich der putativen α -Helix 1 von GvpM überwiegend negativ auf die Menge der gebildeten Gasvesikel (keine oder reduzierte Menge) in den Zellen auswirkt. Morphologisch haben diese Substitutionen jedoch keinen oder nur einen geringfügigen Effekt auf die Gasvesikelbildung, da in Vac-positiven Zellen Wildtyp-ähnliche Gasvesikel beobachtet werden konnten.

Zusätzlich zu den phänotypischen Untersuchungen der Mutationen in diesem Bereich wurden diese Varianten in Hinblick auf die L/M-Interaktion untersucht. Dazu wurde das GvpM-Fragment M(25N) verwendet und entsprechenden Mutationen inseriert (Abbildung 28).

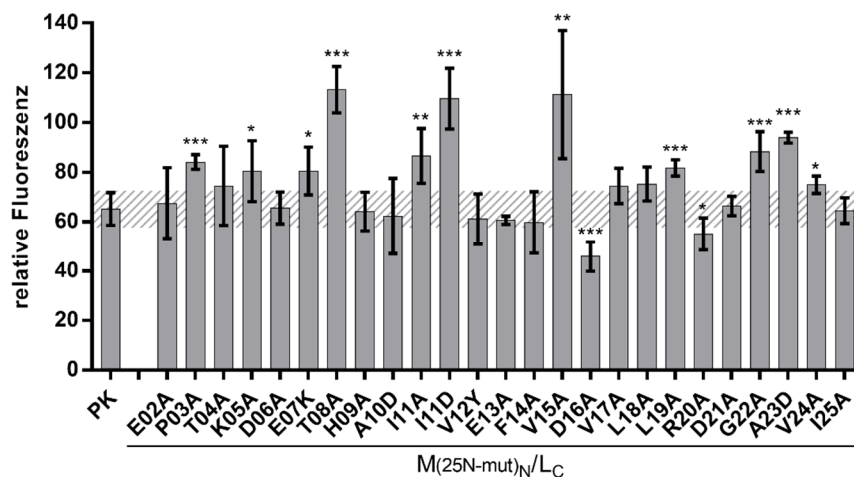


Abbildung 28: Untersuchung der *in vivo* Protein-Protein Interaktion von $M(25N-mut)_N/L_C$ -Transformanten. Dargestellt ist die Kombination, die die höchste Fluoreszenz zeigte. Die Fluoreszenz wurde in LAU/mm² bestimmt und die relative Fluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz von *Hfx. volcanii* WR340 Zellen berechnet. Die Schraffierung kennzeichnet die Standardabweichung der Positivkontrolle (PK; $M(25N)_N/L_C$). Alle Experimente wurden mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Signifikanz wurde durch den Student'schen t-Test bestimmt. Signifikant verschieden von der Positivkontrolle *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Die $M_{(25N-mut)N/LC}$ -Transformanten, die die Varianten E02A, T04A, D06A, H09A, A10D, V12Y, E13A, F14A, V17A, L18A, R20A, D21A und I25A synthetisieren, zeigen keine signifikant veränderten rf-Werte im Vergleich zur Positivkontrolle ($M_{(25N)N/LC}$) (Abbildung 28). Folglich besitzen diese Aminosäuren keine Bedeutung in der L/M-Interaktion. Ein signifikanter Anstieg der rf-Werte wurde jedoch bei den $M_{(25N-mut)N/LC}$ -Transformanten, die die GvpM-Varianten P03A, K05A, E07K, T08A, I11A, I11D, V15A, L19A, G22A, A23D und V24A synthetisieren, beobachtet (Abbildung 28). Einzig mit der $M_{(25N-mut)N/LC}$ -Transformanten, die die GvpM-Variante D16A synthetisiert, wurde ein signifikant niedrigerer rf-Wert ermittelt (Abbildung 28). Durch die Betrachtung der Aminosäurepositionen innerhalb der GvpM-Struktur wird deutlich, dass diejenigen Aminosäuresubstitutionen, die einen positiven Effekt auf die L/ $M_{(25N)}$ -Fluoreszenz haben, sich überwiegend an der Oberfläche von GvpM befinden (Abbildung 29A). Zudem ist auffällig, dass sich diese Aminosäuren an zwei unterschiedlichen Stellen im Protein clustern. Zum einen befinden sich die Aminosäuren, die eine positive Auswirkung auf die Fluoreszenz haben, in den ersten 11 aa der α -Helix 1 und zum anderen im *loop* 1 (zwischen α -Helix 1 und β -Faltblatt 1). Ausgenommen sind die Aminosäuren V15 und L19, deren Aminosäurereste Teil der inneren Struktur von GvpM sind. Die Aminosäurereste von D16, deren Substitution zu Alanin als einziges zu signifikant niedrigeren rf-Werten in L/ $M_{(25N)}$ -Transformanten führte, zeigen ebenfalls ins

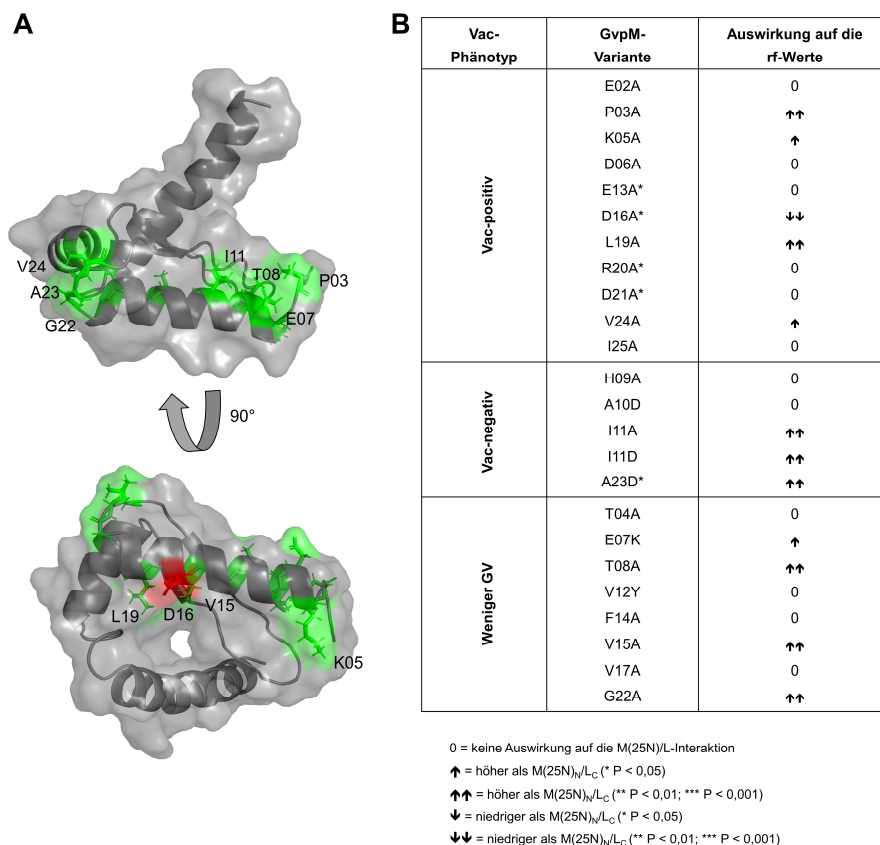


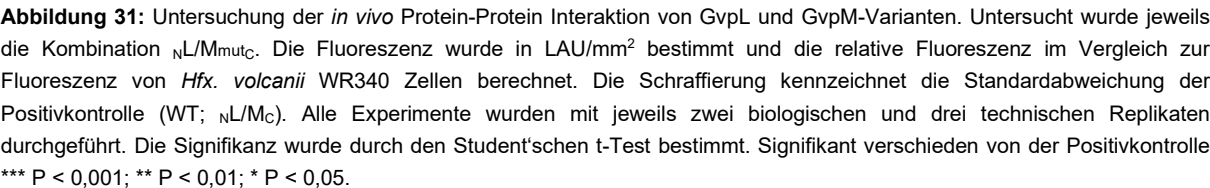
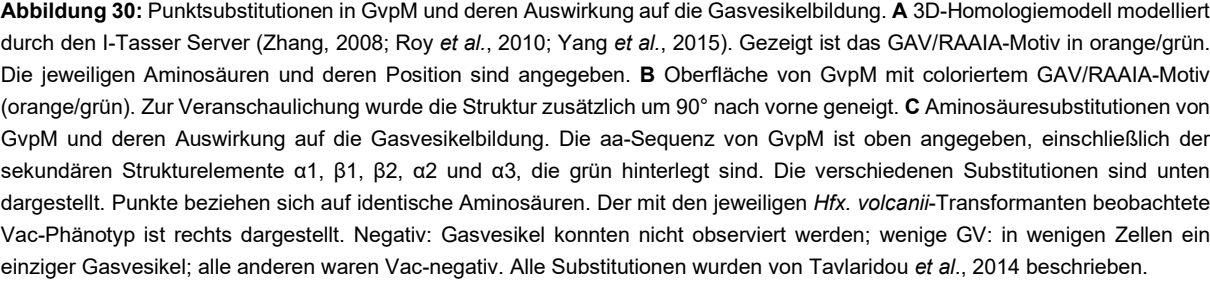
Abbildung 29: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der Interaktion von GvpL und $M_{(25N)}$ -Varianten. **A** 3D-Homologiemodell von GvpM modelliert durch den I-Tasser Server (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Gezeigt sind die Aminosäuren, die sich entweder positiv (grün) oder negativ (rot) auf die L/ $M_{(25N)}$ -Fluoreszenz auswirkten. **B** Auswirkung der verschiedenen GvpM-Varianten auf die Gasvesikelbildung und die $M_{(25N)N/LC}$ -Interaktion. Die Varianten, die mit einem Stern markiert sind, wurden bereits von Tavlaridou *et al.*, 2014 auf GV-Bildung untersucht. Die Untersuchung der L/M-Interaktion mit den $M_{(25N)}$ -Varianten wurde in dieser Arbeit durchgeführt.

Innere der GvpM-Struktur (Abbildung 29A). Offenbar interagiert GvpL mit GvpM über die ersten 11 Aminosäuren der α -Helix 1 und dem *loop* 1.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der Untersuchung der $\Delta M+M_{mut}$ -Transformanten im Hinblick auf Gasvesikelbildung ist auffällig, dass mit GvpM-Varianten, die zu einem Phänotypen mit weniger oder gar keinen Gasvesikeln führen, größtenteils höhere rf-Werte ermittelt wurden als mit der Positivkontrolle (Abbildung 29B). Somit scheint eine höhere Affinität von GvpM zu GvpL sich negativ auf die Gasvesikelbildung auszuwirken. Bei den GvpM-Varianten, die zu einem Vac-positiven Phänotyp führen, war das Ergebnis heterogen. So haben die GvpM Varianten E02A, D06A, E13A, R20A, D21A und I25A sowohl keine Auswirkung auf die Gasvesikelbildung als auch auf die M(25N)/L-Interaktion (Abbildung 29B). Mit den GvpM-Varianten P03A, K05A, L19A und V24A wurden jedoch signifikant höhere rf-Werte im Vergleich zu M(25N)_N/L_C ermittelt (Abbildung 29B). Nur mit der M(25N-mut)-Variante D16A wurden signifikant niedrigere rf-Werte ermittelt, was sich jedoch nicht auf die Gasvesikelbildung auswirkte (Abbildung 29B). Möglicherweise kann der negative Einfluss von D16A auf die L/M-Interaktion durch andere Proteine oder Strukturen von GvpM während der Gasvesikelbildung kompensiert werden.

5.4.3. Untersuchung des GAV/RAAIA-Motives

In der Mutagenesestudie von Tavlaridou *et al.* 2014 wurden einige Punktmutationen in GvpM eingeführt, die sich negativ auf die Gasvesikelbildung auswirkten. Diese umfassen den Bereich bestehend aus den Aminosäuren V15, L19 und den Aminosäuren des GAV/RAAIA-Motivs (G22, A23, V24, R44, A45, A46, I47 und A48). Die Substitutionen V15E, L19E, G22D, A23D, V24D und A48D führten zu einem Vac-negativen Phänotypen in $\Delta M+M_{mut}$ -Transformanten (Abbildung 30C). Die Menge der gebildeten Gasvesikel innerhalb der Zellen wurde durch die Substitutionen R44E, A45E, A46E und I47A negativ beeinflusst, da in $\Delta M+M_{mut}$ -Transformanten in wenigen Zellen maximal 1-2 Gasvesikel beobachtet werden konnte (Abbildung 30C). Betrachtet man diese aa in dem 3D-Strukturmodell von GvpM so ist auffällig, dass die untersuchten Aminosäuren in benachbarten Bereichen lokalisiert sind (Abbildung 30A+B). Eine Ausnahme bildeten die Substitutionen V15E und L19E, welche in der α -Helix 1 lokalisiert sind und ins Innere des Proteins zeigen. Um zu untersuchen, ob das Fehlen von Gasvesikeln an einem gestörten L/M-Interaktionsverhalten liegt, wurden die untersuchten GvpM-Varianten mittels split-GFP auf Interaktion mit GvpL getestet. Dazu wurden die mutierten *gvpM*-Leserahmen aus den von Tavlaridou *et al.*, 2014 hergestellten Plasmiden mit den in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert und über die jeweiligen Schnittstellen in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert. Da die Kombination _NL/M_C die höchste Fluoreszenz zeigte (Abschnitt 5.3.3) wurde ebenfalls diese Kombination mit den GvpM-Varianten getestet. Die Untersuchung der Transformanten wurde wie in Abschnitt 4.4.12 beschrieben durchgeführt.



Zusammenfassend haben Punktmutationen im GAV/RAAIA-Motiv von GvpM zum Teil eine verstärkende und zum Teil keine Wirkung auf die L/M-Interaktion. Einzig die Mutation A46E wirkte sich leicht negativ auf die L/M-Interaktion aus. Das Alanin an Position 46 ist die einzige Aminosäure aus dem Motiv, das in das Innere des Proteins ragt. Durch die Substitution des kleinen ungeladenen Alanins durch die relativ große und saure Aminosäure Glutaminsäure ist es möglicherweise zu einer Konformationsänderung im Protein gekommen, wodurch die L/M-Interaktion ungünstig beeinflusst wird. Die Substitutionen G22D, V24D und A45E wirkten sich hingegen verstärkend auf die L/M-Interaktion aus. Diese Aminosäuren sind an der Oberfläche von GvpM lokalisiert und somit zugänglich für GvpL. Die Substitutionen A23D, R44E, I47A und A48D, die sich ebenfalls an der Oberfläche von GvpM befinden, wirkten sich hingegen nicht auf die L/M-Interaktion aus. Offenbar sind diese Aminosäuren nicht an der L/M-Interaktion beteiligt. Mit den GvpM-Varianten V15E und L19E wurde wie erwartet keine Veränderung in der L/M-Interaktion festgestellt, da diese Aminosäuren innerhalb der GvpM-Struktur lokalisiert sind. Folglich sind die Aminosäuren V15 und L19 nicht an der L/M-Interaktion beteiligt. Widersprüchlich ist jedoch, dass in den Untersuchungen von $M_{(25N-mut)N}/L_C$ -Transformanten die Transformanten $M_{(25N-V15A)N}/L_C$ und $M_{(25N-L19A)N}/L_C$ signifikant erhöhte rf-Werte aufwiesen (Abschnitt 5.4.2). Dies ist möglicherweise der Tatsache geschuldet, dass durch die Verwendung des $M_{(25N)}$ -Fragmentes diese Aminosäuren jetzt an der Oberfläche liegen und nun zugänglich für GvpL sind. Insgesamt konnte das GAV/RAAIA-Motiv als bedeutend für die L/M-Interaktion und die Bildung von Gasvesikeln identifiziert werden.

6. DISKUSSION

In *Halobacterium salinarum* PHH1 führt die Expression der Gene *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* zur Bildung von Gasvesikeln, mit deren Hilfe es sich in aquatischer Umgebung innerhalb der Wassersäule positionieren und in Gebiete mit optimalen Wachstumsbedingungen gelangen kann. Diese Gene kodieren jeweils für ein Gasvesikelprotein (Gvp), wovon die Proteine GvpF, GvpG, GvpH, GvpI, GvpJ, GvpK, GvpL, und GvpM akzessorische Gasvesikelproteine sind. Die *gvpFGHIJKLM*-mRNA wird schon sehr früh in der Wachstumsphase gebildet, noch bevor erste Gasvesikelstrukturen erkennbar sind. Dies lässt vermuten, dass die akzessorischen Gasvesikelproteine an der Initiation oder in frühen Stadien der Gasvesikelbildung beteiligt sein könnten. Es ist möglich, dass diese Proteine einen oder mehrere Proteinkomplexe bilden, an den oder dem GvpA binden und die Gasvesikelhülle ausbilden kann. Die Existenz und der Aufbau dieses Komplexes ist jedoch ungeklärt. In vergangenen *in vitro* Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass GvpM mit GvpH, GvpJ oder GvpL interagiert (Tavlaridou *et al.*, 2014). Eine Interaktion von GvpM und GvpG konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Die für diese Untersuchungen verwendeten _{His}Gvp-Fusionsproteine wurden jedoch heterolog in *E. coli* synthetisiert und in Hochsalz renaturiert. Durch fehlende enzymatische Aktivitäten der akzessorischen Gasvesikelproteine ist ein Nachweis des Erfolges der Renaturierung nicht möglich und es könnte zu Fehlfaltungen gekommen sein. Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, die die *in vivo* Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteine unter nativen Bedingungen visualisiert, um die bisherige Interaktionsstudie der Gasvesikelproteine zu verifizieren und zu komplettieren. Zusätzlich sollten mögliche Interaktionsstellen in GvpM zu anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen näher bestimmt werden. Darüber hinaus wurde die Existenz eines möglichen Komplexes dieser Gvp Proteine mit Hilfe der Cellulose-Bindedomäne aus *Clostridium thermocellum* untersucht. Durch diese Untersuchungen wurde ein Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine erstellt und es konnte ein tieferes Verständnis über die frühen Stadien der Gasvesikelbildung erlangt werden.

6.1. Zwei verschiedene Methoden zum *in vivo* Nachweis haloarchaealer Protein-Protein Interaktionen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen der Protein-Protein Interaktionen mit _{His}Gvp-Fusionsproteinen führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen (Abschnitt 5.1), da aufgrund der verwendeten Gvp-Antiseren Kreuzreaktionen gegenüber den _{His}Gvp-Fusionsproteinen aufgetreten sind (Abbildung 8). So wurden nicht nur die potentiellen Interaktionspartner in den Elutionsfraktionen detektiert, sondern auch die _{His}Gvp-Fusionsproteine, was eine eindeutige Aussage über putative Interaktionen unmöglich macht. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche

Methoden etabliert, um die Protein-Protein Interaktionen, die von Tavlaridou *et al.* begonnen wurden, zu verifizieren und zu vervollständigen.

6.1.1. CBD-tag als *in vivo* Nachweis für Protein-Protein Interaktionen in *Hfx. volcanii*

Mit Hilfe der Cellulose-Bindedomäne des CipB-Proteins aus *Clostridium thermocellum* konnte erstmals reines Gasvesikelprotein aus *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten, ohne Co-Präzipitation von Kontaminanten (z.B. PitA), isoliert werden. Es zeigte sich, dass die Verwendung der CBD gegenüber einem 6xHistidin-tag zu deutlich reineren Ergebnissen führt, da in Coomassie-Färbungen von Proteingelen ausschließlich reines CBDGvp-Fusionsprotein (CBD_F, CBD_G, CBD_H, CBD_I, CBD_K und CBD_L) detektiert wurde (Abbildung 10). Lediglich die Reinigung von CBD_J und CBD_M erwies sich als schwierig. Es ist bereits bekannt, dass diese beiden Proteine hydrophob sind und unspezifische Proteinaggregate bilden (Tavlaridou *et al.*, 2013; Tavlaridou *et al.*, 2014). Diese Proteinaggregate konnten weder durch die Verwendung der CBD, noch durch den Einsatz verschiedener Detergenzien (DDM und OGP in verschiedenen Konzentrationen) vollständig gelöst werden, weshalb diese nur in geringen Mengen im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen gereinigt werden konnten (Abbildung 11, Tabelle 3).

Nichtsdestotrotz wurde die Isolierung über CBD zur Verifizierung der von Tavlaridou *et al.*, 2014 erzielten Ergebnisse und zu deren Vervollständigung verwendet. Im Gegensatz zu Tavlaridou *et al.* wurden die zu untersuchenden putativen Interaktionspartner zeitgleich in *Hfx. volcanii* WR340-Transformanten synthetisiert. Somit findet die Interaktion bereits in der Zelle statt und nicht erst *in vitro* auf der verwendeten Matrix. Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen konnten so teilweise verifiziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine miteinander interagieren. Lediglich die Interaktion von GvpL mit GvpH oder GvpI war uneindeutig (Abbildung 13). Im Gegensatz zur Studie von Tavlaridou *et al.* war eine Interaktion von GvpM und GvpG mit dieser Methode nachweisbar. Dieses konträre Ergebnis unterstreicht die Bedeutsamkeit der *in vivo*-Bedingungen im Organismus und ob eine Interaktion *in vivo* oder *in vitro* stattfindet.

Zusammenfassend war die Verwendung der CBD zur Isolation akzessorischer Gasvesikelproteine und zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen äußerst geeignet. Nachteilig ist jedoch, dass der CBD-tag aufgrund fehlender Erkennungssequenzen für Proteasen nicht von den fusionierten Proteinen abgelöst werden konnte. Die Verwendung solcher Erkennungssequenzen wäre jedoch für zukünftige Untersuchungen von gereinigten Gvp Proteinen von Interesse.

6.1.2. Split-GFP als *in vivo* Nachweis für Protein-Protein Interaktionen in *Hfx. volcanii*

Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten split-GFP Methode ist es erstmals möglich, Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gasvesikelproteine in *Hfx. volcanii* zu visualisieren und relativ zu quantifizieren. Die split-GFP Methode ist in anderen Domänen bereits ein etabliertes System zum Nachweis von Interaktionen; bei den Haloarchaea aus der Domäne der Archaea ist diese jedoch ein

Novum. Die Methode beruht auf der Spaltung des salzadaptierten mGFP2, welches durch eine Substitution des Phenylalanins an Position 64 gegen Leucin deutlich stärker fluoresziert als das ursprünglich für Haloarchaea etablierte smRS-GFP (Reuter and Maupin-Furlow, 2004; Born and Pfeifer, 2019). Die beiden GFP-Fragmente NGFP (18 kDa) und CGFP (9 kDa) werden mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert (Abschnitt 4.4.12). Im Falle einer Interaktion der fusionierten Proteine können die beiden GFP-Fragmente zu einem funktionalen GFP assemblieren und in *Hfx. volcanii*-Transformanten fluoreszieren. Die beiden Fusionsmöglichkeiten der GFP-Fragmente an dem N- oder C-Terminus eines Gasvesikelproteins resultieren pro zu untersuchender Interaktion in acht unterschiedlichen Transformanten. Die Untersuchung der Interaktion von GvpM und GvpL zeigte z.B., dass sowohl der Fusionsort als auch das fusionierte GFP-Fragment Auswirkung auf die Fluoreszenz hat. So zeigten nur wenige der Transformanten eine signifikante Fluoreszenz (Abschnitt 5.3.2). Offenbar können die GFP-Fragmente durch sterische Hindernisse nicht immer assemblieren. Allgemein ist jede Interaktion individuell zu betrachten und für jede Protein-Protein Interaktion die Fusionskombination neu zu bestimmen.

Darüber hinaus ist die split-GFP Methode temperatur- und wachstumsphasenabhängig. Transformanten, die ausschließlich bei 37 °C inkubiert wurden, zeigten in der stationären Wachstumsphase ($OD_{600} \approx 2$) gegenüber der exponentiellen ($OD_{600} \approx 1$) eine 1,6 bis 3-fach erhöhte Fluoreszenz (Abschnitt 5.3.2). Zur Vergleichbarkeit wurde jeweils die gleiche Zellzahl untersucht. Möglicherweise liegt die erhöhte Fluoreszenz darin begründet, dass das GFP in der stationären Wachstumsphase länger reifen konnte und dadurch mehr fluoreszierende GFP-Moleküle vorliegen. Die Chromophore vergleichbarer GFP-Varianten benötigen Reifungszeiten von ca. 6 Stunden bei RT (Lundqvist *et al.*, 2019). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit unabhängig von der Wachstumsphase eine starke Temperaturabhängigkeit festgestellt (Abschnitt 5.3.2). Transformanten, die nach einer 1-tägigen Inkubation bei 37 °C zusätzlich über Nacht bei 30 °C inkubiert wurden und sich ebenfalls in der exponentiellen Wachstumsphase befinden ($OD_{600} \approx 1,5$), fluoreszierten bis zu 9,5-fach stärker als Transformanten in ähnlicher Wachstumsphase, die ausschließlich bei 37 °C inkubiert wurden (Abschnitt 5.3.2). Somit ist die zusätzliche Inkubation bei 30 °C essentiell für die Detektion einer Interaktion mit Hilfe des split-GFP.

Die optimale Wachstumstemperatur von *Hfx. volcanii* liegt bei 42 °C, aber bei 37 °C zeigt es noch ausreichend Wachstum. Bei 30 °C ist jedoch kaum ein Wachstum von *Hfx. volcanii* zu verzeichnen. Daher ist eine Inkubation bei 37 °C zunächst notwendig für das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase. Der zweite Inkubationsschritt bei 30 °C dient der Assemblierung und Reifung des split-GFPs. Es ist bereits aus zahlreichen Studien bekannt, dass das Wildtyp-GFP erst bei Temperaturen weit unter 37 °C zu einem fluoreszierenden Protein reift (Siemering *et al.*, 1996; Kiyonaka *et al.*, 2013; Nakano *et al.*, 2017). Die meisten *in vivo* Untersuchungen benötigen jedoch Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C. Zur Verbesserung der Thermostabilität und Reifung des GFPs in *Hfx. volcanii* bei 37 °C wurde die Variante mGFP2 erstellt, die ein Derivat des smRS-GFPs ist (Reuter and Maupin-Furlow, 2004; Born and Pfeifer, 2019). Durch die Aminosäuresubstitution F64L in mGFP2 wurde die Fluoreszenz in *Hfx. volcanii*-Transformanten 2,5-fach verstärkt und auch schwache Promotoraktivitäten konnten detektiert werden (Scholz *et al.*, 2000; Born and Pfeifer, 2019). Daher

eignete sich mGFP2 für die *in vivo* Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gvps mittels split-GFP, da auch schwache Interaktionen detektiert werden können.

Zusammenfassend ist es erstmals möglich, mit Hilfe der split-GFP Methode Protein-Protein Interaktionen akzessorischer Gvps in *Hfx. volcanii* zu identifizieren und relativ zu quantifizieren. Unter Berücksichtigung einer zweistufigen Inkubationstemperatur bei 37 °C (für ausreichendes Zellwachstum), gefolgt von 30 °C (Unterstützung der Assemblierung und Reifung des split-GFP) zeigte sich diese Methode zudem äußerst reproduzierbar.

6.2. Das Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben erstmals einen Einblick in das Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine. Tavlaridou *et al.* 2014 haben bereits gezeigt, dass einige dieser Proteine interagieren. Es ist möglich, dass diese in den frühen Stadien der Gasvesikelbildung eine Rolle spielen, da die mRNA des *gvpFGHIJKLM*-Transkriptes schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gebildet wird (Offner and Pfeifer, 1995), noch bevor erste Gasvesikelstrukturen erkennbar sind. Zudem sind die meisten akzessorischen Gasvesikelproteine (bis auf GvpI und GvpH) essentiell für die Bildung eines gasgefüllten Vesikels (Offner *et al.*, 2000). Daher ist es möglich, dass die akzessorischen Gvps einen oder mehrere Proteinkomplexe bilden, an dem GvpA möglicherweise anlagern kann. Teile dieser Arbeit beschäftigten sich damit, die Interaktionsstudien von Tavlaridou *et al.* zu vervollständigen und darüber hinaus weitere Indizien für die Existenz des/der Proteinkomplexe zu identifizieren. Mit Hilfe des in dieser Arbeit erstellten Interaktionsnetzwerkes kann ein erstes Konzept der Wechselwirkungen innerhalb des möglichen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine erstellt werden.

6.2.1. Isolation eines möglichen Proteinkomplexes

Zum Nachweis eines möglichen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine wurden Pulldown-Assays mit Zelllysaten von *Hfx. volcanii*-Transformanten durchgeführt, die zeitgleich *cBDM* als *bait* und die restlichen sieben akzessorischen Gasvesikelproteine GvpF bis GvpL als *prey* synthetisierten. In den Western-Analysen der Elutionsfraktion inkubiert mit den jeweiligen Gvp-Antisera konnten alle akzessorischen Gasvesikelproteine detektiert werden (Abbildung 14). Lediglich die Detektion von GvpG war uneindeutig, da eine 3-fach vergrößerte Proteinbande sichtbar war. Es ist jedoch unklar, ob es sich um ein Multimer oder eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen handelt. Ob die detektierten Proteine einen Komplex bilden oder alle zeitgleich *cBDM* binden ist fraglich, da Untersuchungen zeigten, dass GvpM mit allen akzessorischen Gasvesikelproteinen interagieren kann (Abbildung 13). Aufgrund sterischer Hindernisse, die bei der zeitgleichen Interaktion aller Proteine an *cBDM* entstehen würden, erscheint dies jedoch unwahrscheinlich. Bei Betrachtung der split-GFP

Untersuchungen wird zudem deutlich, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine unterschiedliche Affinitäten zueinander aufweisen und GvpM möglicherweise einzig mit GvpL innerhalb des putativen Proteinkomplexes interagiert (Abbildung 32). Diese Aspekte unterstützen die Vermutung, dass mit Hilfe von CBDM als *bait* ein oder mehrere Proteinkomplexe isoliert wurden. Die Stöchiometrie des Komplexes und ob es sich um einen oder mehrere Sub-Komplexe handelt, bleibt aber ungeklärt.

6.2.2. Das Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gvps und GvpA

Um die Wechselwirkung innerhalb des Interaktionsnetzwerkes näher untersuchen zu können und möglicherweise einen tieferen Einblick in den Aufbau des möglichen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine zu erlangen, wurden diverse Interaktionsstudien durchgeführt (Abschnitt 5.2 und 5.3). Wie bereits in Abschnitt 6.1.1 beschrieben, wurde mit Hilfe der CBDGvp -Fusionsproteine gezeigt, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine, mit Ausnahme von GvpL und GvpH bzw. GvpI, interagieren können (Abbildung 32A). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Kontrast zu den Ergebnissen, die mittels split-GFP erzielt wurden. In dieser Studie wurden alle akzessorischen Gasvesikelproteine und GvpA mit den split-GFP Fragmenten fusioniert und deren Interaktionen untersucht (Abbildung 32A). Nicht alle der untersuchten Transformanten fluoreszierten signifikant. Mit Hilfe der ermittelten rf-Werte wurde ein erstes Affinitäten-bezogenes Interaktionsnetzwerk erstellt. Bei den Ergebnissen der Studie wurden die verschiedenen Interaktionen in drei Gruppen gegliedert – keine Interaktion: $\text{rf} < 1$; schwache Interaktion: $\text{rf} 1\text{-}5$; eindeutige Interaktion: $\text{rf} > 5$. Für die grafische Darstellung des Interaktionsnetzwerkes wurden jedoch nur die Interaktionen berücksichtigt, die rf-Werte > 5 aufwiesen (Abbildung 32B).

Das ermittelte Interaktionsnetzwerk deutet darauf hin, dass GvpF das Bindeglied zwischen GvpA und dem Komplex der akzessorischen Gasvesikelproteine darstellt, da GvpF das einzige dieser Proteine ist, das mit GvpA interagiert (Abbildung 32B). GvpF wiederum ist über GvpL, und womöglich über GvpG, mit dem möglichen Komplex verbunden. Die Bindung zwischen GvpG und GvpF ist jedoch umstritten, da diese mit einer rf von 5,07 (Abbildung 32B) im Vergleich zur Bindung zwischen GvpL und GvpG ($\text{rf} 77,45$; Abbildung 32B) nur schwach ist.

Im Allgemeinen scheint GvpL eine zentrale Rolle bei den identifizierten Proteininteraktionen zu spielen, da alle akzessorischen Gasvesikelproteine mit GvpL wechselwirken (Abbildung 32). GvpL könnte somit im Zentrum des möglichen Proteinkomplexes stehen. Die akzessorischen Gasvesikelproteine GvpK, GvpJ und GvpM interagieren bei dieser Interaktionsmessmethode ausschließlich mit GvpL. Diese sind neben GvpA die kleinsten Gasvesikelproteine. Darüber hinaus weisen GvpJ und GvpM Sequenzähnlichkeiten zu GvpA auf. Möglicherweise tragen sie zur Stabilisierung des Komplexes bei oder fungieren als eine Art Platzhalter für den GvpA-Einbau.

Interessant sind die Proteine GvpH und GvpI. Beide sind nicht essentiell für die Bildung eines gasgefüllten Vesikels, sondern sind für die Formgebung (ΔI Gasvesikel sind sehr lang) und Stabilisierung (ΔH Gasvesikel sind instabil) der Gasvesikel zuständig (Offner *et al.*, 2000). Die Untersuchung der Interaktion von GvpH und GvpI mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen

zeigte, dass beide untereinander und auch mit GvpL und GvpF interagieren. Die Affinität von GvpH und GvpL zu GvpL ist etwa 2-fach höher als zu GvpF (Abbildung 32B). Daher ist es wahrscheinlich, dass GvpH und GvpL bevorzugt GvpL statt GvpF binden. Beide Proteine zeigen bei der Interaktion miteinander sehr hohe rf-Werte (rf 20, Abbildung 32B). Womöglich bilden GvpH und GvpL einen Subkomplex, der mit GvpL bzw. GvpF wechselwirken kann, jedoch kein fester Bestandteil des Proteinkomplexes ist. Dies deutet darauf hin, dass diese als Helferproteine während der Gasvesikelbildung fungieren könnten und zeitweise oder zu einem definierten Zeitpunkt mit der Gasvesikelhülle assoziieren.

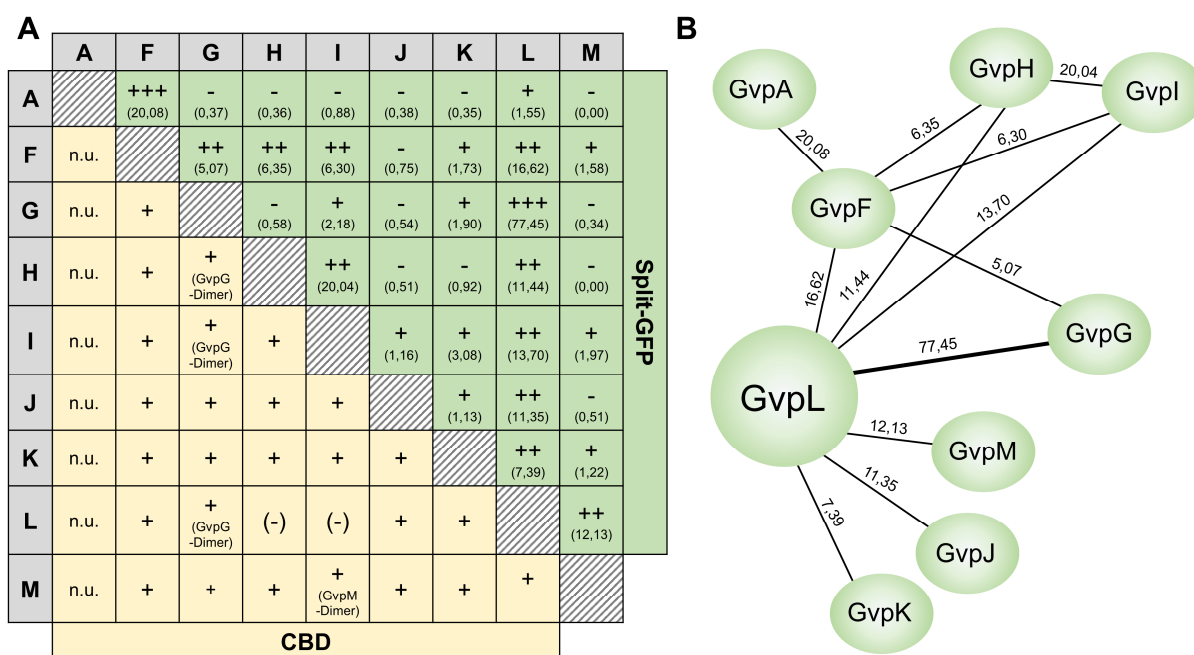


Abbildung 32: Zusammenfassung der Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Protein-Protein Interaktionen. **A** Tabellarische Auflistung der mittels Cellulose-Bindedomäne (gelb markierte Kästchen) und split-GFP (grün markierte Kästchen) erhaltenen Ergebnisse. Ein Plus (+) symbolisiert nachgewiesene und ein Minus (-) nicht nachgewiesene Interaktionen. In Klammern gesetzt Zeichen weisen auf Uneindeutigkeit hin. Im Falle der split-GFP Untersuchungen sind zusätzlich die erzielten rf-Werte angegeben. -: rf 0-1; +: rf 1-5; ++: rf > 5; +++: rf > 20; n.u.: nicht untersucht **B** Interaktionsnetzwerk der anhand der split-GFP Methode ermittelten rf-Werte. Berücksichtigt wurden nur die Interaktionen, die einen rf-Wert größer als 5 aufwiesen. Die jeweiligen rf-Werte sind an den Verbindungslinien angegeben.

Doch wie erklärt sich die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der split-GFP Methode und denen der CBD-Methode? Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen, die mit den GvpM-Fragmenten (Abschnitt 5.3.5) erzielt wurden wird deutlich, dass beispielweise GvpM sehr wohl in der Lage ist mit anderen Proteinen, außer GvpL, zu interagieren. Die Interaktion der verschiedenen Proteine zu GvpM kann jedoch womöglich durch sterische Hindernisse, die die GFP-Assemblierung stören, nicht visualisiert werden. Darüber hinaus wird die Interaktion über unterschiedliche Positionen in GvpM vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass GvpM hauptsächlich über den C-terminalen Bereich mit den Proteinen GvpF, GvpG, GvpH, GvpJ und GvpK interagieren kann (Abschnitt 5.3.5). Eine Interaktion mit dem vollständigen GvpM ist jedoch nicht oder nur kaum nachweisbar. Der C-terminale Bereich von GvpM ist jedoch nicht relevant für die Gasvesikelbildung (Winter *et al.*, 2018; diese Arbeit), weshalb es

unwahrscheinlich ist, dass diese Proteine tatsächlich zu Beginn oder während der Gasvesikelbildung interagieren. Darüber hinaus kann mit Hilfe der Pulldown-Assays keine Aussage über die Stärke der einzelnen Interaktionen getroffen werden. Unter Zuhilfenahme der split-GFP Methode ist dies jedoch möglich, da die Stärke der jeweiligen Interaktionen über die relative Fluoreszenz der einzelnen Transformanten ausgedrückt werden kann. So ist es möglich, dass mit den Pulldown-Assays eine Interaktion festgestellt werden konnte, diese jedoch zu schwach ist, um mittels split-GFP detektiert zu werden. Ob solch schwache Interaktionen eine Rolle während der Gasvesikelbildung spielen, bleibt jedoch fraglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der Pulldown-Assays mit CBDGvp -Fusionsproteine eine qualitative Aussage über mögliche Interaktionen getroffen werden kann, eine relative Quantifizierung ist jedoch nur durch Zuhilfenahme der split-GFP Methode möglich.

6.2.3. Der Einfluss von GvpH auf das Interaktionsverhalten der akzessorischen Gasvesikelproteine

GvpH wird eine helfende Funktion zugeschrieben, da es nicht für die Bildung gasgefüllter Vesikel benötigt wird, sondern eher die Gasvesikel stabilisiert (Offner *et al.*, 2000) und daher zu den nicht-essentiellen akzessorischen Gasvesikelproteinen zählt. GvpH wurde in immunologischen und massenspektrometrischen Analysen in Gasvesikelpräparationen detektiert, weshalb vermutet wurde, dass dieses Teil der Gasvesikelstruktur ist (Shukla and DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Es ist jedoch unklar, ob GvpH tatsächlich Teil der Struktur ist, oder ob durch seine helfende Funktion bei bspw. der Stabilisierung der Gasvesikelhülle, GvpH nur zeitweise mit der Gasvesikelhülle assoziiert. Die Menge von GvpH spielt zudem eine entscheidende Rolle, da die vermehrte Synthese von GvpH zusätzlich zur Expression der p-vac Region zu Vac-negativen Zellen führt. Durch die Synthese vergleichbarer Mengen GvpM kann dieser negative Effekt kompensiert werden (Tavlaridou *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurde der Effekt von GvpH auf die Protein-Protein Interaktion von GvpM mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen untersucht (Abschnitt 5.3.6). Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Anwesenheit von GvpH in $\text{H+N}_X/\text{M}_C$ -Transformanten ($X = \text{GvpF, GvpG, GvpI, GvpJ, GvpK}$ oder GvpL) in allen Fällen negativ auf die Fluoreszenz auswirkte. Durch die Anwesenheit aller akzessorischer Gasvesikelproteine in $\Delta\text{X+N}_X/\text{M}_C$ -Transformanten konnte dieser negative Effekt nicht oder nur teilweise kompensiert werden (Abbildung 23C).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass GvpJ und GvpM weder in Anwesenheit von GvpH, noch in Anwesenheit der anderen akzessorischen Gasvesikelproteine interagieren (Abbildung 23C). Durch Pulldown-Assays mittels *CBD-tag* konnte jedoch eine Interaktion von GvpJ und GvpM nachgewiesen werden (Abbildung 13, Abbildung 32A). Im Unterschied dazu wurde in den split-GFP Untersuchungen lediglich mit den C-terminalen Fragmenten von GvpM eine Interaktion festgestellt (Abbildung 22, Abbildung 32). GvpM und GvpJ sind sehr hydrophobe Proteine, die zur Bildung unspezifischer Proteinaggregate neigen, was unter Verwendung von split-GFP möglicherweise zu sterischen Hindernissen bei der GFP-Assemblierung führen könnte. GvpH besitzt jedoch die

Eigenschaft, GvpM „in Lösung“ zu halten und die Aggregatbildung von GvpM zu unterbinden (Tavlaridou *et al.*, 2013; Tavlaridou *et al.*, 2014). In Pulldown-Assays mittels CBD-*tag* konnte nachgewiesen werden, dass GvpH sowohl mit GvpJ als auch mit GvpM interagieren kann (Abbildung 32), doch in Untersuchungen mittels split-GFP konnte lediglich mit dem C-terminalen GvpM-Fragment eine Interaktion mit GvpH festgestellt werden (Abbildung 22, Abbildung 32). Darüber hinaus wurde in Untersuchungen der Dimerisierung von GvpM mittels split-GFP gezeigt, dass die letzten beiden α -Helices für dessen Dimerisierung relevant sind (Abbildung 21). Dieses Ergebnis wird durch Western-Analysen der C-terminalen Deletionsvarianten gestützt, die keine oder vermindert GvpM-Dimere zeigten (Tavlaridou *et al.*, 2014; Musillo, 2017). So ist es möglich, dass GvpH im C-terminalen Bereich von GvpM bindet und so dessen Aggregatbildung verhindert. Doch wenn GvpH und GvpJ zeitgleich in diesem Bereich binden, ist es möglich, dass Interaktionsstellen von GvpH blockiert werden und eine J/M-Interaktion nicht stattfinden kann. Die Untersuchung der J/M-Interaktion in Anwesenheit von GvpH unterstützten diese Hypothese, da in H+NJ/M_C-Transformanten keine signifikante Fluoreszenz detektiert werden konnte (Abbildung 23). Auch die Anwesenheit anderer akzessorischer Gasvesikelproteine in Δ J+NJ/M_C-Transformanten hatte keinen Einfluss auf die J/M-Interaktion, wodurch es unwahrscheinlich erscheint, dass diese Proteine im putativen Proteinkomplex bzw. während der Gasvesikelbildung interagieren.

Besonders hervorzuheben sind die Ergebnisse der Untersuchung der Δ NL/M_C-Transformanten in Anwesenheit von GvpH (H+N_L/M_C) und anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen (Δ L+N_L/M_C). Δ NL/M_C-Transformanten zeigten mit einem rf-Wert von 12,13 die höchste Fluoreszenz im Vergleich zu den untersuchten Transformanten. In Anwesenheit von GvpH reduzierte sich diese um etwa 76 %, aber war im Vergleich zu den anderen untersuchten Transformanten noch nachweisbar (Abbildung 23C). Die Reduktion könnte einerseits dadurch begründet sein, dass sowohl GvpM als auch GvpH nahezu identische Affinitäten zu GvpL zeigen (Abbildung 32A). Andererseits konnte mittels GvpM-Fragmente gezeigt werden, dass sowohl GvpL als auch GvpH mit dem C-terminalen Bereich von GvpM ähnlich stark interagieren (Abbildung 22). Somit liegt die Vermutung nahe, dass alle drei Proteine um vorhandene Interaktionsstellen konkurrieren. Durch die Anwesenheit aller akzessorischer Gasvesikelproteine in Δ L+N_L/M_C-Transformanten konnten 50 % der ursprünglichen Fluoreszenz der Δ NL/M_C-Transformanten wiedererlangt werden (Abbildung 23C). Somit konnte der negative Einfluss von GvpH auf die L/M-Interaktion teilweise kompensiert werden. Unter Einbeziehung der Untersuchungen der Einzelinteraktionen mittels split-GFP wird deutlich, dass GvpH bevorzugt GvpI statt GvpL bzw. GvpM bindet (Abbildung 32B). Dadurch könnten weniger Interaktionsstellen in GvpL von GvpH blockiert sein und GvpM könnte wieder vermehrt binden. Ein vollständiges Wiedererlangen der ursprünglichen L/M-Fluoreszenz ist jedoch nicht möglich, da GvpL zusätzlich zu GvpM mit weiteren akzessorischen Gasvesikelproteinen interagiert (Abbildung 32B).

Diese Ergebnisse geben einen tieferen Einblick in das Interaktionsverhalten und das Netzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine. Es wurde deutlich, dass dieses hochkomplex ist und sich die Proteine gegenseitig in ihrem Interaktionsverhalten beeinflussen können. Der negative Einfluss von GvpH auf die Interaktion von GvpM mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen deutet zudem darauf hin, dass GvpH mit den meisten akzessorischen Gvps interagiert. Darüber hinaus wurde deutlich,

dass GvpL der einzige Interaktionspartner von GvpM in dem möglichen Proteinkomplex der akzessorischen Gvps ist, da einzig die L/M-Interaktion in deren Anwesenheit nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse bekräftigen das mittels split-GFP erstellte Interaktionsnetzwerk. An dieser Stelle wäre es interessant, diese Studie mit anderen Kombinationen und auch in Anwesenheit aller Gasvesikelproteine zu erweitern.

6.3. Die Interaktion von GvpM und GvpL

GvpM und GvpL sind für die Gasvesikelbildung essentiell und konnten in geringen Mengen als Bestandteil der Gasvesikelhülle festgestellt werden (Shukla and DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Die mRNA von *gvpL* und *gvpM* wird als Teil des *gvpFGHIJKLM*-Transkriptes in geringen Mengen während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet. Beide Proteine sind vermutlich zusammen mit anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen in frühen Stadien der Gasvesikelbildung involviert (Offner *et al.*, 2000). Zudem weist GvpM, wie GvpJ, einige Aminosäuresequenzähnlichkeiten zu GvpA auf (Tavlaridou *et al.*, 2013). GvpL hingegen weist strukturelle Ähnlichkeiten zu GvpF auf (Winter *et al.*, 2018), dem einzigen akzessorischen Gasvesikelprotein, das mit GvpA, dem Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle, interagieren kann. Von GvpM wurden im Rahmen dieser und in vergangenen Arbeiten (Tavlaridou *et al.*, 2014; Musillo, 2017) verschiedene Varianten hergestellt und deren Auswirkung auf die Gasvesikelbildung untersucht. Eine Zusammenfassung der Varianten ist in Abbildung 33 gezeigt.

In dieser und in vergangenen Arbeiten (Tavlaridou *et al.*, 2014) zeigten GvpL und GvpM eine eindeutige Interaktion sowohl in Pulldown-Experimenten als auch unter Verwendung der split-GFP Methode. In den Pulldown-Assays wurde nachgewiesen, dass GvpM mit allen akzessorischen Gvps

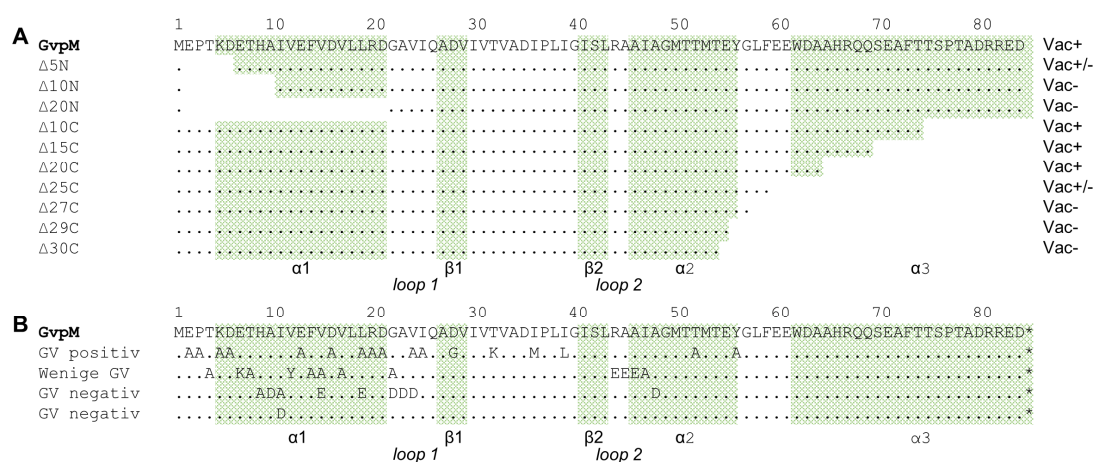


Abbildung 33: Zusammenfassung aller bisher untersuchten GvpM-Varianten und deren Auswirkung auf die GV-Bildung (Tavlaridou *et al.*, 2014; Musillo, 2017 und diese Arbeit). **A** Untersuchung der GvpM-Deletionsvarianten. Auf der rechten Seite ist jeweils die Auswirkung auf den Gasvesikel (Vac)-Phänotypen angegeben. Vac+: Wildtyp-ähnliche GV; Vac-: keine intakten GV in den Transformanten sichtbar; Vac+/-: einige Transformanten besitzen wenige (1-5) GVs. **B** Substitutionen in GvpM und deren Auswirkung auf die GV-Bildung. Auf der linken Seite ist jeweils die Auswirkung der verschiedenen Mutationen auf die GV-Bildung in *Hfx. volcanii*-Transformanten angegeben. Die vermutete Sekundärstruktur ist unter den Alignments und in grün dargestellt. Die Punkte symbolisieren Übereinstimmungen und Sterne markieren ein Stop-Codon.

potentiell eine Interaktion eingehen kann. Eine quantitative Aussage konnte jedoch mit der split-GFP Methode getätigt werden. Da die Affinität von GvpM zu GvpL 6- bis 12-fach stärker ist als zu den anderen akzessorischen Gasvesikelproteinen (Abbildung 32) liegt die Vermutung nahe, dass GvpL der einzige Interaktionspartner von GvpM in dem putativen Proteinkomplex der GV-Bildung ist. Diese Vermutung wurde durch die Untersuchungen der L/M-Interaktion in Anwesenheit aller akzessorischer Gasvesikelproteine bestärkt (Abschnitt 6.2.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Interaktionsstellen für GvpL und GvpM bestimmt. Einige der bereits untersuchten GvpM-Varianten zeigten einen Vac-negativen Phänotypen. Durch den Einsatz dieser Varianten konnte überprüft werden, ob die Vac-Negativität auf eine fehlende oder gestörte L/M-Interaktion zurückzuführen ist.

6.3.1. GvpL interagiert mit der α -Helix 1 und den loops 1+2 von GvpM

Es wurde bereits gezeigt (Tavlaridou *et al.*, 2014; diese Arbeit), dass der N-terminale Bereich von GvpM eine essentielle Rolle bei der Gasvesikelbildung und der L/M-Interaktion spielt. Bereits die Deletion von 5 Aminosäuren führt in diesem Bereich zu einer reduzierten Gasvesikelmenge und die Deletion von 10 Aminosäuren zum vollständigen Verlust dieser in *Hfx. volcanii*-Transformanten (Tavlaridou *et al.*, 2014). Western-Analysen mit einem GvpM-Antiserum bestätigten das Vorhandensein der M_{Δ5N}- und M_{Δ10N}-Deletionsvarianten, die M_{Δ20N}-Deletionsvariante konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Tavlaridou *et al.*, 2014). Folglich führt die Deletion von 20 Aminosäuren am N-Terminus von GvpM zum Verlust der Proteinstabilität und zum Abbau des Proteins. Der N-terminale Bereich von GvpM ist somit für dessen strukturelle Integrität und auch für die Gasvesikelbildung von großer Bedeutung. Um die Bedeutung des N-terminalen Bereiches von GvpM für die L/M-Interaktion näher zu untersuchen, wurden die entsprechenden Deletionsvarianten hinsichtlich der Interaktionsfähigkeit mit GvpL analysiert. Bereits eine Deletion von fünf Aminosäuren am N-Terminus führt zu einer 50 %igen Reduktion der Fluoreszenz im Vergleich zum unveränderten GvpM in entsprechenden *N*L/M_{mutc}-Transformanten, bei einer Deletion von 10 Aminosäuren konnte nur noch 15 % der Ausgangsfluoreszenz detektiert werden (Abbildung 25C). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass wichtige Interaktionsstellen der L/M-Interaktion in den ersten 10 Aminosäuren von GvpM lokalisiert sind. Dieses Ergebnis wurde durch Interaktionsstudien mit den GvpM-Fragmenten (M_{25N}, M_{25C}) und GvpL untermauert (Abbildung 22). Durch diese Untersuchungen konnte der N-terminale Bereich von GvpM als hauptverantwortlich für die L/M-Interaktion und auch für die Gasvesikelbildung identifiziert werden.

Zur Lokalisierung einzelner Aminosäuren, die die L/M-Interaktion vermitteln, wurden gezielt Aminosäuren im N-terminalen Bereich von GvpM substituiert und die resultierenden GvpM-Varianten sowohl auf Interaktionsfähigkeit mit GvpL als auch auf Gasvesikelbildung untersucht (Abschnitt 5.4). Hierbei konnten zwei Bereiche in GvpM lokalisiert werden, die sowohl relevant für die L/M-Interaktion als auch für die Gasvesikelbildung sind (Abbildung 34A+B). Aminosäuresubstitutionen in den gezeigten Bereichen führten zu einer verstärkten L/M-Bindung. Lediglich eine Aminosäuresubstitution (D16A) führte zu einer Reduktion der Fluoreszenz in *N*L/M(25N-D16A)_C-Transformanten (Abbildung 29).

Der erste relevante Bereich für die L/M-Interaktion ist der Anfang der α -Helix 1, der die Aminosäuren P03, E07, T08 und I11 umfasst und zur Vereinfachung als PETI-Motiv bezeichnet wird. Die Aminosäurereste dieser Aminosäuren bilden einen Teil der Proteinoberfläche und sind in gleicher Richtung orientiert (Abbildung 34, Tabelle 6). Die Aminosäuresubstitutionen E07K, T08A, I11A und I11D wirken sich einerseits negativ auf die Gasvesikelbildung aus und andererseits verstärkend auf die L/M-Interaktion. Lediglich die Substitution P03A hatte keinen Effekt auf die Gasvesikelbildung. Ein Aminosäuresequenzvergleich aller bekannter GvpM-Sequenzen zeigt, dass die Aminosäuren P03 und I11 in allen Organismen konserviert sind (Anhang Abbildung 36). Die Aminosäure E07 ist dagegen nur in der Domäne der Archaea konserviert (entweder D oder E). Bei der Aminosäure T08 handelt es sich dagegen in einigen Organismen um eine Insertion.

Ein weiterer relevanter Bereich ist das GAV/RAAIA-Motiv, das sich in den *loops* 1 und 2 befindet und die Aminosäuren G22, A23, V24, R44, A45, A46, I47 und A48 umfasst. Diese Aminosäuren sind in der Struktur von GvpM benachbart und bis auf die Aminosäure A46, die ins Innere des Proteins ragt, bilden sie einen Teil der Proteinoberfläche (Abbildung 34A+B, Tabelle 6). Darüber hinaus sind diese Aminosäuren in allen gasvesikelbildenden Organismen konserviert (Anhang Abbildung 36). Substitutionen in diesem Bereich haben einen negativen Effekt auf die Gasvesikelbildung und führen

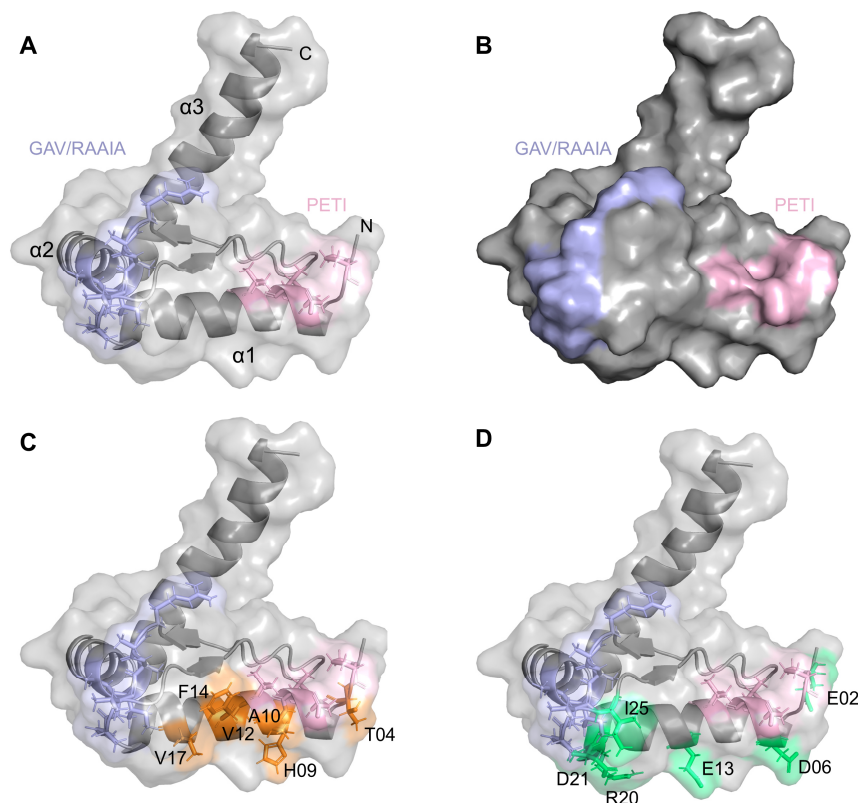


Abbildung 34: Aminosäurepositionen in GvpM. **A + B** Aminosäuren in GvpM, an denen GvpL möglicherweise bindet. Es ist das durch den I-Tasser Server (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015) vorhergesagte 3D-Strukturmodell von GvpM dargestellt. Die Aminosäurereste des GAV/RAAIA-Motives sind lila markiert und die Aminosäurereste der α -Helix 1, die die L/M-Interaktion vermitteln, in rosa (PETI). N und C zeigen jeweils den Amino- bzw. Carboxy-Terminus. In **B** ist die Oberflächenstruktur von GvpM mit entsprechender farblicher Markierung dargestellt. **C** In orange sind die Aminosäuren dargestellt, deren Substitutionen keinen Effekt auf die rf-Werte haben und zu *Hfx. volcanii*-Transformanten mit *Vac*^{+/−}-Phänotypen (1-5 GVs pro Zelle) oder keinen Gasvesikeln führen. **D** In grün sind die Aminosäuren dargestellt, deren Substitutionen weder einen Effekt auf die rf-Werte noch auf die Gasvesikelbildung haben.

entweder zu einem Vac-negativen Phänotypen oder zu einer Reduktion der Gasvesikelmenge. Zusätzlich verstärken die Aminosäuresubstitutionen G22A, G22D, V24A, V24D und A45E die L/M-Interaktion (Abbildung 31, Tabelle 6). Die Aminosäuresubstitutionen A23D, R44E, A46E, I47A und A48D hingegen haben keine Auswirkung auf die L/M-Interaktion.

Im Allgemeinen wurde bei allen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen der L/M-Interaktion und der Gasvesikelbildung beobachtet. So führte eine verstärkte Bindung von GvpL und GvpM in den meisten Fällen zu einem Vac-negativen Phänotypen. Ausnahmen bildeten die Substitutionen K05A, V15A und L19A (Tabelle 6), die keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Gasvesikelbildung hatten, aber eine verstärkte L/M-Interaktion zeigten. Da diese jedoch entgegengesetzt dem PETI-Motiv orientiert sind und die Aminosäuren V15 und L19 zudem nicht an der Proteinoberfläche präsentiert sind, ist es unwahrscheinlich, dass diese aktiv an der L/M-Bindung beteiligt sind. Die Aminosäuresubstitutionen T04A, H09A, A10D, V12Y, F14A und V17A wirkten sich dagegen negativ auf die Gasvesikelbildung, aber nicht auf die L/M-Interaktion aus (Tabelle 6). Bis auf T04, A10 und F14 sind diese Aminosäuren anders als das PETI- oder das GAV/RAAIA-Motiv ausgerichtet, und somit offenbar nicht an der L/M-Interaktion beteiligt (Abbildung 34C). Somit liegt bei diesen Aminosäuresubstitutionen der negative Effekt auf die Gasvesikelbildung nicht an einer veränderten L/M-Interaktion, sondern an der durch die Substitutionen verursachten Veränderungen der biochemischen Eigenschaft der jeweiligen Aminosäure. Die Aminosäuresubstitutionen E02A, D06A, E13A, R20A, D21A und I25A wirkten sich dagegen weder auf die Gasvesikelbildung noch auf die L/M-Interaktion aus (Tabelle 6). Diese Aminosäuren sind in entgegengesetzter Richtung des PETI-Motives orientiert und nicht an der L/M-Interaktion beteiligt (Abbildung 34D).

Unter Berücksichtigung der Position in der Proteinstruktur, der Auswirkung auf die Gasvesikelbildung und die L/M-Interaktion und dem Grad der Konservierung innerhalb der Aminosäuresequenz scheinen die Aminosäuren der Motive GAV/RAAIA und PETI an der L/M-Interaktion beteiligt zu sein. Dabei korreliert die Interaktionsstärke von GvpL und GvpM mit der Gasvesikelbildung in umgekehrter Weise, denn eine verstärkte Bindung von GvpL und GvpM wirkt sich negativ auf die Gasvesikelbildung aus. Es ist möglich, dass eine erhöhte Affinität von GvpM und GvpL zu einer veränderten Stöchiometrie innerhalb des Interaktionsnetzwerkes der akzessorischen Gasvesikelproteine führt, wodurch die Gasvesikelbildung gestört ist. Bereits Tavlaridou *et al.*, 2013 haben gezeigt, dass die relative Menge einiger akzessorischer Gasvesikelproteine zueinander eine entscheidende Rolle für die Gasvesikelbildung spielt. So führen größere Mengen GvpM zu Vac-negativen Zellen, die Anwesenheit vergleichbarer Mengen GvpL kann diesen negativen Effekt jedoch kompensieren. Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Komplexität des Interaktionsnetzwerkes der akzessorischen Gasvesikelproteine.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der GvpM-Mutagenesestudie und Auswirkung auf die Gasvesikelbildung und die Interaktion von GvpM und GvpL. Die mit Stern markierten Substitutionen wurden von Tavlaridou *et al.*, 2014 hergestellt und in Hinblick auf GV-Bildung untersucht.

Motiv	Substitution	Vac-Phänotyp	Auswirkung L/M-Interaktion	Konservierung	Position in GvpM
PETI	P03A	positiv	erhöht	ja	α -Helix 1
	E07K	wenige GV		ja (innerhalb Archaea)	
	T08A	negativ		nein (teilweise Insertion)	
	I11A	negativ		ja	
	I11D	negativ		ja	
GAV/RAAIA	G22A	wenige GV	erhöht	ja	loop 1
	G22D*	negativ	erhöht		
	A23D*	negativ	keine Auswirkung		
	V24A	positiv	erhöht		
	V24D*	negativ	erhöht		
	R44E*	wenige GV	keine Auswirkung	ja	loop 2 und Anfang α -Helix 2
	A45E*	wenige GV	erhöht		
	A46E*	wenige GV	keine Auswirkung		
	I47A*	wenige GV	keine Auswirkung		
	A48D*	negativ	keine Auswirkung		
Kein Motiv	K05A	positiv	erhöht	ja	Bis auf K05 an der Oberfläche präsentiert und entgegengesetzt von PETI
	V15A	wenige GV			
	L19A	positiv			
	T04A	wenige GV	keine Auswirkung	nein	α -Helix 1 und entgegengesetzt von PETI und GAV/RAAIA
	H09A	negativ		nein	
	A10D	negativ		ja	
	V12Y	wenige GV		ja	
	F14A	wenige GV		ja (teilweise L oder V)	
	V17A	wenige GV		ja	
	E02A	positiv	keine Auswirkung	nein	α -Helix 1 und entgegengesetzt von PETI und GAV/RAAIA
	D06A	positiv		nein	
	E13A*	positiv		ja (E oder D)	
	R20A*	positiv		ja (in Archaea)	
	D21A*	positiv		ja (teilweise K)	
	I25A	positiv		ja (teilweise L)	

6.3.2. Die α -Helix 3 von GvpM ist für die Gasvesikelbildung und die L/M-Interaktion nicht essentiell

Die Analysen der Deletionsvarianten von GvpM ergaben, dass die letzten 25 Aminosäuren keine Relevanz bei der Gasvesikelbildung haben (Abbildung 33A). Auch ohne diese Aminosäuren werden immer noch Gasvesikel gebildet. Erst eine Deletion von 27 Aminosäuren am C-terminalen Ende von GvpM führt zu einem vollständigen Verlust der Gasvesikel in *Hfx. volcanii*-Transformanten. Western-Analysen mit einem GvpM-Antiserum zeigten, dass alle Deletionsvarianten synthetisiert werden und diese GvpM-Varianten stabil sind (Tavlaridou *et al.*, 2014; Musillo, 2017; Winter *et al.*, 2018). Aus der vorgeschlagenen Sekundärstruktur von GvpM wird deutlich, dass der für die Gasvesikelbildung nicht-relevante Bereich vollständig die putative α -Helix 3 umfasst (Abbildung 33A). Darüber hinaus zeigt ein Aminosäuresequenzvergleich des GvpM verschiedener Mikroorganismen, dass dieser Bereich nicht konserviert vorliegt (Anhang Abbildung 36). Folglich ist die putative α -Helix 3 von GvpM nicht relevant für die Gasvesikelbildung.

Um die Relevanz des C-terminalen Bereiches von GvpM in Hinblick auf die L/M-Interaktion zu überprüfen, wurden Interaktionsstudien mit den oben erwähnten GvpM-Deletionsvarianten und GvpL durchgeführt (Abschnitt 5.4.1). Die erzielten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die letzten 25 Aminosäuren für die Interaktion nicht bedeutend sind, da sich eine Deletion von 20 Aminosäuren kaum auf die L/M-Interaktion auswirkt (Reduktion der Fluoreszenz um 20-25 %, Abbildung 25). Im Gegensatz dazu wirkt sich die Deletion von 27 und mehr Aminosäuren deutlich negativer auf die L/M-Interaktion (Reduktion der Fluoreszenz um ca. 30 bis 40 %; Abbildung 25) und auch auf die Gasvesikelbildung aus (Vac-negative Zellen; Musillo, 2017). Eine Ausnahme bildet die Deletionsvariante $\Delta 25C$. Diese führt in $\Delta M + M_{\Delta 25C}$ -Transformanten zu einer reduzierten Gasvesikelmenge und zu einer Reduktion der Fluoreszenz in $NL/M_{\Delta 25C}$ -Transformanten um ca. 50 %. Es ist möglich, dass diese Deletion zu Änderungen in der Konformation von GvpM führt, die hinderlich für eine L/M-Interaktion und somit für die Gasvesikelbildung ist. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass eine Korrelation zwischen der L/M-Interaktion und der Gasvesikelbildung besteht.

Da jedoch wider Erwarten geringfügige Veränderungen in der Interaktionsstärke von GvpL und den C-terminalen GvpM-Deletionsvarianten festgestellt wurden, bestand die Vermutung, dass zusätzliche Interaktionsstellen von GvpL in der α -Helix 3 von GvpM lokalisiert sein könnten. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die L/M-Interaktion mit dem C-terminalen Fragment von GvpM (die letzten 25 Aminosäuren von GvpM; M_{25C}) untersucht (Abschnitt 5.3.5). Es konnte keine signifikante Veränderung in der Fluoreszenz im Vergleich zum vollständigen GvpM beobachtet werden (Abbildung 22). Die Untersuchung der L/M-Interaktion mit dem N-terminalen GvpM-Fragment (M_{25N}) zeigte jedoch eine ca. 4-fach erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem vollständigen GvpM. Dies lässt darauf schließen, dass tatsächlich zusätzliche Interaktionsstellen von GvpL in der α -Helix 3 von GvpM lokalisiert sind, die jedoch keine Auswirkung auf die Gasvesikelbildung haben, da bei einer Deletion dieses Bereiches immer noch Gasvesikel gebildet werden können. Vermutlich kompensiert der N-terminale Bereich von GvpM oder andere Gasvesikelproteine dieses Defizit und trotz der Deletion der α -Helix 3 können Gasvesikel entstehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die L/M-Interaktion relevant für die Gasvesikelbildung ist. Dabei ist die α -Helix 3 von GvpM sowohl für die Gasvesikelbildung als auch für die L/M-Interaktion nicht essentiell.

6.4. Das Modell der Gasvesikelbildung

Über den genauen Ablauf der Gasvesikelbildung ist bis heute nur wenig bekannt. Einige Indizien sprechen dafür, dass die Gasvesikel über Assemblierung der involvierten Gasvesikelproteine gebildet werden (Walsby and Fogg, 1969) und der Assemblierungsprozess möglicherweise einem Template als Assemblierungsstartpunkt zugrunde liegt (Walsby, 1994; Yang *et al.*, 2016). Zu Beginn der Gasvesikelbildung sind diese als kleine bikonische und „aufgeblasene“ Strukturen erkennbar. Sobald der Bikonus seinen kritischen Durchmesser erreicht hat (in *Hbt. salinarum* ca. 0,2 bis 0,25 μm), wird dieser auf eine finale Länge von bis zu 1,5 μm verlängert. Zahlreiche vergangene Studien zeigten, dass die Verlängerung des Gasvesikels möglicherweise über einen zentralen Punkt (nicht immer genau mittig) des zylinderförmigen Körpers erfolgt, da in einigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen in diesem Bereich eine deutlich veränderte Rippe zu erkennen ist (Waaland and Branton, 1969; Jost and Jones, 1970; Walsby, 1972; Bollschweiler, 2015). Dabei können die Durchmesser der beiden Zylinderhälften variieren (Bollschweiler, 2015). Dies deutet darauf hin, dass die Verlängerung des zylinderförmigen Körpers möglicherweise entgegengesetzt verläuft.

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnte ein tieferer Einblick in die Gasvesikelbildung von *Hbt. salinarum* erlangt werden. Es wurde ein erstes Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine ermittelt und die mögliche Existenz eines Proteinkomplexes dieser Proteine bekräftigt (Abschnitt 6.2). Dieser Komplex dient möglicherweise als Startpunkt und/oder als Template während der Gasvesikelassemblierung. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass die mRNA des *gvpFGHIJKLM*-Transkriptes bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gebildet wird, noch bevor erste sichtbare Gasvesikelstrukturen erkennbar sind (Offner and Pfeifer, 1995). Das erstellte Interaktionsnetzwerk deutet darauf hin, dass GvpA über GvpF an den oder die Proteinkomplexe der akzessorischen Gasvesikelproteine bindet (Abbildung 32) und schließlich die Rippen der Gasvesikelhülle ausbilden kann. Es ist jedoch ungewiss, ob dieser Komplex ausschließlich als Startpunkt der Gasvesikelbildung dient, oder dieser während der gesamten Gasvesikelbildung als Template zur Verfügung steht. Einige Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass der oder die möglichen Komplexe während der gesamten Gasvesikelreifung am Gasvesikel assoziiert sind, da die meisten akzessorischen Gasvesikelproteine (bis auf GvpK) in Gasvesikelpräparationen sowohl immunologisch als auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten (Shukla and DasSarma, 2004; Chu *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte mit Hilfe von goldmarkierten Antikörpern in Gasvesikelpräparationen mit kollabierten Gasvesikeln aus *Microcystis aeruginosa* erste Hinweise darauf gefunden werden, dass GvpF, und womöglich der gesamte Proteinkomplex der akzessorischen Gasvesikelproteine, an der inneren Oberfläche der Gasvesikel lokalisiert ist (Xu *et al.*, 2014). Es bleibt

jedoch weiterhin unklar, ob solche möglichen Proteinkomplexe der akzessorischen Gasvesikelproteine in den Spitzen der konischen Kappen, im Übergang zwischen den Kappen und dem zylindrischen Körper und/oder in der Mitte der Gasvesikel lokalisiert sind.

Darüber hinaus ist es möglich, dass GvpI in der Längendeterminierung der Gasvesikel involviert ist, da ΔI -Transformanten (enthalten eine p-vac Region mit deletiertem *gvpI*-Leserahmen) deutlich längere Gasvesikel bildeten (Offner *et al.*, 2000). Auch war die Anzahl an Gasvesikeln pro Zelle deutlich verringert. Dies deutet darauf hin, dass die Menge an synthetisiertem GvpA unverändert bleibt, jedoch mehr Protein in einen Gasvesikel inkorporiert wird. Daher lag die Vermutung nahe, dass GvpI möglicherweise mit GvpA interagiert und somit eine weitere GvpA-Assemblierung verhindert. Diese Vermutung konnte jedoch nicht durch die hier untersuchten Interaktionen bestätigt werden, da keine A/I-Interaktion festgestellt werden konnte (Abbildung 32). Es ist daher möglich, dass GvpI über einen anderen Weg, beispielsweise durch die Interaktion mit einem oder mehreren akzessorischen Gasvesikelproteinen, den weiteren GvpA-Einbau unterbindet. Darüber hinaus ist es möglich, dass GvpI nicht oder nicht nur an der Längenbestimmung beteiligt ist. Es wäre denkbar, dass GvpI an der Mengenregulation der gebildeten Proteinkomplexe, die möglicherweise als Startpunkt der GV-Assemblierung dienen, beteiligt ist. Wenn weniger Komplexe gebildet werden, können auch nur wenige Gasvesikel entstehen. Um diese Vermutungen zu bekräftigen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

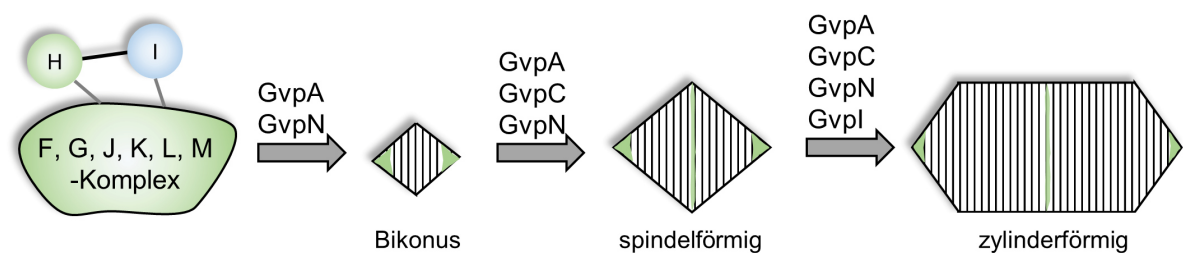


Abbildung 35: Schematische Darstellung des Modells der Gasvesikelbildung. Dargestellt ist der mögliche Prozess der Reifung eines Gasvesikels beginnend mit dem Proteinkomplex der akzessorischen Gasvesikelproteine (grün) und endend im reifen zylinderförmigen Gasvesikel.

7. FAZIT UND AUSBLICK

In dieser Arbeit konnte erstmals unter Verwendung von zwei verschiedenen Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen ein Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine erstellt werden, das einen Einblick in die frühen Stadien der Gasvesikelbildung gewährt. Es zeigte sich, dass alle akzessorischen Gasvesikelproteine miteinander vernetzt sind, was die Vermutung bestärkt, dass diese möglicherweise einen oder mehrere Komplexe bilden, an denen GvpA assemblieren und die Gasvesikel ausbilden kann. Die Anbindung von GvpA an den putativen Proteinkomplex geschieht offenbar über GvpF.

Darüber hinaus wurde erstmals die Existenz des möglichen Proteinkomplexes der akzessorischen Gasvesikelproteine mit Hilfe der Cellulose-Bindedomäne, unter Zuhilfenahme von CBD_M als *bait*-Protein, bekräftigt, da alle akzessorischen Gasvesikelproteine in Western-Analysen des Pulldown-Assays mit den jeweiligen Gvp-Antiseren nachgewiesen werden konnten. Es ist jedoch unklar, ob es sich dabei um einen oder mehrere Subkomplexe handelt. Zukünftig wäre es von Interesse, weitere Proteine, wie bspw. GvpA, als *bait* zu verwenden, um tiefere Einblicke in die Komplexbildung der akzessorischen Gasvesikelproteine zu erlangen. Mit geeigneten massenspektrometrischen Analysen könnten die Größe und der Aufbau der möglichen isolierten Komplexe untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt), die jedoch weiteren Optimierungen bedürfen. Um die erzielten Daten auswerten zu können, ist es zwingend notwendig, die Massen der einzelnen Gasvesikelproteine genau zu bestimmen. Hierzu ist es erforderlich, gereinigtes Protein in ausreichenden Mengen zu isolieren. Unter Verwendung der Cellulose-Bindedomäne ist es möglich, die akzessorischen Gasvesikelproteine in ausreichender Reinheit zu isolieren, die Reinigung der hydrophoben Proteine GvpJ und GvpM zeigt sich jedoch weiterhin problematisch. Daher ist es zukünftig von Interesse, weitere Isolationsmethoden zu entwickeln, die es ermöglichen, auch hydrophobe Proteine, die zur Aggregatbildung neigen, zu isolieren. Die Cellulose-Bindedomäne ist mit ca. 18 kDa darüber hinaus im Vergleich zu den Gasvesikelproteinen ein verhältnismäßig großes Protein, das die Bestimmung der Proteinmasse erschwert. Daher ist es ratsam zusätzlich einen Vektor zu konstruieren, der es ermöglicht, nach der Proteinreinigung die CBD abzuspalten.

Darüber hinaus könnte die Zusammensetzung der Gasvesikelhülle mittels Immunogold oder anderen Labeling-Methoden analysiert werden. Mit Hilfe dieser Methoden wäre es möglich, einzelne Proteine mit goldmarkierten Antikörpern zu visualisieren, um diese mit Hilfe von mikroskopischen Verfahren in der Gasvesikelhülle zu lokalisieren. Erste Untersuchungen mit goldmarkierten Antikörpern gegen GvpF wurden bereits von Xu *et al.*, 2014 an Gasvesikeln aus *Microcystis aeruginosa* durchgeführt. Um jedoch Proteine, die an der inneren Oberfläche der Gasvesikelhülle lokalisiert sind visualisieren zu können, ist es notwendig die Gasvesikel vor der Untersuchung zu zerstören.

Mit Hilfe der split-GFP Methode wurden zum ersten Mal die Protein-Protein Interaktionen der akzessorischen Gasvesikelproteine quantifiziert. Die ermittelten Affinitäten wurden durch die relative

Fluoreszenz (rf-Wert) ausgedrückt. Dadurch sind lediglich relative Werte verfügbar, die zudem stark abhängig von dem verwendeten Imager sind, aber auch von den sterischen Gegebenheiten der Proteinpartner beeinflusst sein können. Daher wäre es in der Zukunft wichtig, die Bindungsaffinitäten mittels K_D -Werte zu bestimmen. Die Bestimmung könnte bspw. über Microscale Thermophoresis (MST) erfolgen. MST basiert auf dem Nachweis einer temperaturbedingten Fluoreszenzveränderung eines Targets in Abhängigkeit von der Konzentration eines nicht-fluoreszierenden Liganden. Dabei ist es nahezu unbedeutend in welcher Lösung sich die zu untersuchenden Proteine befinden, wodurch die hochmolaren Salzkonzentrationen, die die Gasvesikelproteine benötigen, keinen Einfluss auf die Messungen nehmen. Somit könnten die K_D -Werte der einzelnen Interaktionen bestimmt und die in dieser Arbeit ermittelten Affinitäten verifiziert werden.

Schlussendlich sollten die Gasvesikelproteine GvpC, GvpN und GvpO in die Interaktionsstudien mit einbezogen werden, um das Interaktionsnetzwerk aller Gasvesikelproteine zu vervollständigen. Dabei wäre die Interaktion von GvpA und GvpC besonders von Interesse, um nachzuweisen, ob GvpC tatsächlich über eine Bindung an GvpA die Gasvesikelhülle von außen stabilisiert. Darüber hinaus wäre es interessant, an welchen Bereichen von GvpA GvpC bindet.

Alles in allem konnte mit dieser Arbeit ein erstes Interaktionsnetzwerk der akzessorischen Gasvesikelproteine unter Berücksichtigung von GvpA erstellt und ein neues Verständnis der frühen Gasvesikelbildung erlangt werden.

8. LITERATUR

- Algubory, K., and Houdebine, L. (2006).** *In vivo* Imaging of Green Fluorescent Protein-expressing Cells in Transgenic Animals Using Fibred Confocal Fluorescence Microscopy. *European Journal of Cell Biology* 85, 837-845.
- Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K., and Mevarech, M. (2010).** Improved Strains and Plasmid Vectors for Conditional Overexpression of His-Tagged Proteins in *Haloferax volcanii*. *Applied and environmental microbiology* 76, 1759-1769.
- Allers, T., Ngo, H.-P., Mevarech, M., and Lloyd, R.G. (2004).** Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* Based on the *leuB* and *trpA* Genes. *Applied and environmental microbiology* 70, 943-953.
- Andar, A.U., Karan, R., Pecher, W.T., Dassarma, P., Hedrich, W.D., et al. (2017).** Microneedle-Assisted Skin Permeation by Non-toxic Bioengineerable Gas Vesicle Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 14, 953-958.
- Bauer, M., Marschhaus, L., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S., et al. (2008).** Overlapping Activator Sequences Determined for two Oppositely Oriented Promoters in Halophilic Archaea. *Nucleic Acids Research* 36, 598-606.
- Beard, S.J., Hayes, P.K., Pfeifer, F., and Walsby, A.E. (2002).** The Sequence of the Major Gas Vesicle Protein, GvpA, Influences the Width and Strength of Halobacterial Gas Vesicles. *FEMS Microbiology Letters* 213, 149-157.
- Bieger, B., Essen, L.-O., and Oesterhelt, D. (2003).** Crystal Structure of Halophilic Dodecin. *Structure* 11, 375-385.
- Bischoff, K.M., and Rodwell, V.W. (1996).** 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase from *Haloferax volcanii*: Purification, Characterization, and Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178, 19-23.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., and Mevarech, M. (2003).** Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* by Use of the *pyrE* Gene. *Journal of Bacteriology* 185, 772-778.
- Blakeley, B.D., Chapman, A.M., and Mcnaughton, B.R. (2012).** Split-superpositive GFP Reassembly is a Fast, Efficient, and Robust Method for Detecting Protein-Protein Interactions *in vivo*. *Molecular BioSystems* 8, 2036-2040.
- Blecher, O., Goldman, S., and Mevarech, M. (1993).** High Expression in *Escherichia coli* of the Gene Coding for Dihydrofolate Reductase of the Extremely Halophilic Archaeobacterium *Haloferax volcanii*. Reconstitution of the Active Enzyme and Mutation Studies. *European Journal of Biochemistry* 216, 199-203.
- Bleiholder, A., Frommherz, R., Teufel, K., and Pfeifer, F. (2012).** Expression of Multiple *tfb* Genes in Different *Halobacterium salinarum* Strains and Interaction of TFB with Transcriptional Activator GvpE. *Archives of Microbiology* 194, 269-279.
- Bollschweiler, D. (2015).** Study of the Archaeal Motility System of *Halobacterium salinarum* by Cryo-Electron Tomography. Ph.D. *Dissertation*, Technische Universität München.
- Born, J., and Pfeifer, F. (2019).** Improved GFP Variants to Study Gene Expression in Haloarchaea. *Frontiers in Microbiology* 10, 1-12.
- Bourdeau, R.W., Lee-Gosselin, A., Lakshmanan, A., Farhadi, A., Kumar, S.R., et al. (2018).** Acoustic Reporter Genes for Noninvasive Imaging of Microorganisms in Mammalian Hosts. *Nature* 553, 86-90.
- Bowen, C.C., and Jensen, T.E. (1965).** Blue-Green Algae: Fine Structure of the Gas Vacuoles. *Science* 147, 1460-1462.

- Bradford, M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brown-Peterson, N., and Salin, M. (1993).** Purification of a Catalase-Peroxidase from *Halobacterium halobium*: Characterization of Some Unique Properties of the Halophilic Enzyme. *Journal of Bacteriology* 175, 4197-4202.
- Cabantous, S., Nguyen, H.B., Pedelacq, J.-D., Koraïchi, F., Chaudhary, A., et al. (2013).** A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association. *Scientific Reports* 3, 1-9.
- Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccai, G., Eisenberg, H., and Mevarech, M. (1993).** Cloning, Sequencing, and Expression in *Escherichia coli* of the Gene Coding for Malate Dehydrogenase of the Extremely Halophilic Archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* 32, 4308-4313.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., and Prasher, D. (1994).** Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 263, 802-805.
- Charlebois, R.L., Lam, W.L., Cline, S.W., and Doolittle, W.F. (1987).** Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its Use in Demonstrating Transformation of an Archaeobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 8530-8534.
- Cherin, E., Melis, J.M., Bourdeau, R.W., Yin, M., Kochmann, D.M., et al. (2017).** Acoustic Behavior of *Halobacterium salinarum* Gas Vesicles in the High-Frequency Range: Experiments and Modeling. *Ultrasound in Medicine and Biology* 43, 1016-1030.
- Childs, T.S., and Webley, W.C. (2012).** *In vitro* Assessment of Halobacterial Gas Vesicles as a *Chlamydia* Vaccine Display and Delivery System. *Vaccine* 30, 5942-5948.
- Chu, L.J., Chen, M.C., Setter, J., Tsai, Y.S., Yang, H., et al. (2011).** New Structural Proteins of *Halobacterium salinarum* Gas Vesicle Revealed by Comparative Proteomics Analysis. *Journal of Proteome Research* 10, 1170-1178.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2005).** Fluorescent Proteins as a Toolkit for *in vivo* Imaging. *TRENDS in Biotechnology* 23, 605-613.
- Cinelli, R.a.G., Ferrari, A., Pellegrini, V., Tyagi, M., Giacca, M., et al. (2000).** The Enhanced Green Fluorescent Protein as a Tool for the Analysis of Protein Dynamics and Localization: Local Fluorescence Study at the Single-molecule Level. *Photochemistry and Photobiology* 71, 771-776.
- Coker, J.A., and Dassarma, S. (2007).** Genetic and Transcriptomic Analysis of Transcription Factor Genes in the Model Halophilic Archaeon: Coordinate Action of TbpD and TfbA. *BMC Genetics* 8, 61.
- Connaris, H., Chaudhuri, J.B., Danson, M.J., and Hough, D.W. (1999).** Expression, Reactivation, and Purification of Enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 38-45.
- Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P.C. (1996).** Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling. *Nature Biotechnology* 14, 315-319.
- Dassarma, P., Zamora, R.C., Muller, J.A., and Dassarma, S. (2012).** Genome-Wide Responses of the Model Archaeon *Halobacterium* sp. Strain NRC-1 to Oxygen Limitation. *Journal of Bacteriology* 194, 5530-5537.
- Dym, O., Mevarech, M., and Sussman, J.L. (1995).** Structural Features that Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. *Science* 267, 1344-1346.
- Eisenberg, H., Mevarech, M., and Zaccai, G. (1992).** "Biochemical, Structural, and Molecular Genetic Aspects of Halophilism," in *Advances in Protein Chemistry*, eds. C.B. Anfinsen, F.M. Richards, J.T. Edsall & D.S. Eisenberg. Academic Press, 1-62.
- Englert, C., Horne, M., and Pfeifer, F. (1990).** Expression of the Major Gas Vesicle Protein Gene in the Halophilic Archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is Modulated by Salt. *Molecular Genetics and Genomics* 222, 225-232.

- Englert, C., Krüger, K., Offner, S., and Pfeifer, F. (1992a). Three Different but Related Gene Clusters Encoding Gas Vesicles in Halophilic Archaea. *Journal of Molecular Biology* 227, 586-592.
- Englert, C., and Pfeifer, F. (1993). Analysis of Gas Vesicle Gene Expression in *Haloferax mediterranei* Reveals that GvpA and GvpC are Both Gas Vesicle Structural Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 268, 9329-9336.
- Englert, C., Wanner, G., and Pfeifer, F. (1992b). Functional Analysis of the Gas Vesicle Gene Cluster of the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* Defines the Vac-Region Boundary and Suggests a Regulatory Role for the *gvpD* Gene or its Product. *Molecular Microbiology* 6, 3543-3550.
- Farhadi, A., Ho, G., Kunth, M., Ling, B., Lakshmanan, A., et al. (2018). Recombinantly Expressed Gas Vesicles as Nanoscale Contrast Agents for Ultrasound and Hyperpolarized MRI. *AIChE Journal* 64, 2927-2933.
- Fine, A., Irihimovitch, V., Dahan, I., Konrad, Z., and Eichler, J. (2006). Cloning, Expression, and Purification of Functional Sec11a and Sec11b, Type I Signal Peptidases of the Archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Bacteriology* 188, 1911-1919.
- Finnigan, G.C., Duvalyan, A., Liao, E.N., Sargsyan, A., and Thorner, J. (2016). Detection of Protein-Protein Interactions at the Septin Collar in *Saccharomyces cerevisiae* Using a Tripartite split-GFP System. *Molecular Biology of the Cell* 27, 2708-2725.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M., and Shoham, M. (1996). Insights into Protein Adaptation to a Saturated Salt Environment from the Crystal Structure of a Halophilic 2Fe-2S Ferredoxin. *Nature Structural Biology* 3, 452-458.
- Gerdes, H.-H., and Kaether, C. (1996). Green Fluorescent Protein: Applications in cell Biology. *FEBS Letters* 389, 44-47.
- Ghosh, I., Hamilton, A.D., and Regan, L. (2000). Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society* 122, 5658-5659.
- Gregor, D., and Pfeifer, F. (2001). Use of a Halobacterial *bgaH* Reporter Gene to Analyse the Regulation of Gene Expression in Halophilic Archaea. *Microbiology* 147, 1745-1754.
- Hahn, J., and Haug, P. (1986). Traces of Archaeobacteria in Ancient Sediments. *Systematic and Applied Microbiology* 7, 178-183.
- Halladay, J.T., Jones, J.G., Lin, F., Macdonald, A.B., and Dassarma, S. (1993). The Rightward Gas Vesicle Operon in *Halobacterium* Plasmid pNRC100: Identification of the *gvpA* and *gvpC* Gene Products by Use of Antibody Probes and Genetic Analysis of the Region Downstream of *gvpC*. *Journal of Bacteriology* 175, 684-692.
- Hartman, A.L., Norais, C., Badger, J.H., Delmas, S., Haldenby, S., et al. (2010). The Complete Genome Sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a Model Archaeon. *PLoS ONE* 5, e9605.
- Hartmann, R., and Oesterhelt, D. (1977). Bacteriorhodopsin-Mediated Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. *European Journal of Biochemistry* 77, 325-335.
- Hartmann, R., Sickinger, H.D., and Oesterhelt, D. (1980). Anaerobic Growth of Halobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 3821-3825.
- Hase, T., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Mevarech, M., and Werber, M.M. (1980). Amino Acid Sequence of 2Fe-2S Ferredoxin from an Extreme Halophile, *Halobacterium* of the Dead Sea. *Biochimica et Biophysica Acta* 623, 139-145.
- Hayes, P.K., Buchholz, B., and Walsby, A.E. (1992). Gas Vesicles are Strengthened by the Outer-Surface Protein, GvpC. *Archives of Microbiology* 157, 229-234.
- Hayes, P.K., Lazarus, C.M., Bees, A., Walker, J.E., and Walsby, A.E. (1988). The Protein Encoded by *gvpC* is a Minor Component of Gas Vesicles Isolated from the Cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis* sp. *Molecular Microbiology* 2, 545-552.

-
- Hechler, T., Frech, M., and Pfeifer, F. (2007). Glucose Inhibits the Formation of Gas Vesicles in *Haloferax volcanii* Transformants. *Environmental Microbiology* 10, 20-30.
- Hechler, T., and Pfeifer, F. (2009). Anaerobiosis Inhibits Gas Vesicle Formation in Halophilic Archaea. *Molecular Microbiology* 71, 132-145.
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., et al. (1990). Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-Resolution Electron Cryo-Microscopy. *Journal of Molecular Biology* 213, 899-929.
- Hirota, N., Matsuo, T., Ikeda, A., Yatsunami, R., Fukui, T., et al. (2005). Role of an N-terminal Domain Found in the Ferredoxin from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*. *Journal of Japanese Society for Extremophiles* 4, 14-24.
- Hofacker, A., Schmitz, K.M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2004). GvpE- and GvpD-mediated Transcription Regulation of the p-gvp Genes Encoding Gas Vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* 150, 1829-1838.
- Hoffman, R.M. (2015). Application of GFP Imaging in Cancer. *Laboratory Investigation* 95, 432-452.
- Holmes, M.L., and Dyll-Smith, M.L. (1990). A Plasmid Vector with a Selectable Marker for Halophilic Archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* 172, 756-761.
- Holmes, M.L., Nuttall, S.D., and Dyll-Smith, M.L. (1991). Construction and Use of Halobacterial Shuttle Vectors and Further Studies on *Haloferax* DNA Gyrase. *Plasmid* 173, 3807-3813.
- Holmes, M.L., Scopes, R.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Englert, C., et al. (1997). Purification and Analysis of an Extremely Halophilic β -Galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1337, 276-286.
- Hong, W., Zhang, J., Feng, Y., Mohr, G., Lambowitz, A.M., et al. (2014). The Contribution of Cellulosomal Scaffoldins to Cellulose Hydrolysis by *Clostridium thermocellum* Analyzed by Using Thermotargetrons. *Biotechnology for Biofuels* 7, 1-15.
- Horne, M., Englert, C., Wimmer, C., and Pfeifer, F. (1991). A DNA Region of 9 kbp Contains all Genes Necessary for Gas Vesicle Synthesis in Halophilic Archaeobacteria. *Molecular Microbiology* 5, 1159-1174.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* 9, 789-798.
- Hu, C.-D., and Kerppola, T.K. (2003). Simultaneous Visualization of Multiple Protein Interactions in Living Cells Using Multicolor Fluorescence Complementation Analysis. *Nature Biotechnology* 21, 539-545.
- Irihimovitch, V., and Eichler, J. (2003). Post-translational Secretion of Fusion Proteins in the Halophilic Archaea *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 12881-12887.
- Jost, M., and Jones, D.D. (1970). Morphological Parameters and Macromolecular Organization of Gas Vacuole Membranes of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 16, 159-164.
- Karan, R., Capes, M.D., and Dassarma, S. (2012). Function and Biotechnology of Extremophilic Enzymes in low Water Activity. *Aquatic Biosystems* 8, 4.
- Kent, K. (2011). Light Activated Reassembly of Split Green Fluorescent Protein. *Journal of the American Chemical Society* 133, 4046-4052.
- Kerscher, L., Oesterheld, D., Cammack, R., and Hall, D.O. (1976). A New Plant-Type Ferredoxin from Halobacteria. *European Journal of Biochemistry* 71, 101-107.
- Kiyonaka, S., Kajimoto, T., Sakaguchi, R., Shinmi, D., Omatsu-Kanbe, M., et al. (2013). Genetically Encoded Fluorescent Thermosensors Visualize Subcellular Thermoregulation in Living Cells. *Nature Methods* 10, 1232-1238.
- Klebahn, H. (1895). "Gasvakuolen, ein Bestandteil der Zellen der wasserblüthebildenden Phycchromaceen." *Flora*.
-

- Knitsch, R., Schneefeld, M., Weitzel, K., and Pfeifer, F. (2017).** Mutations in the Major Gas Vesicle Protein GvpA and Impacts on Gas Vesicle Formation in *Haloferax volcanii*. *Molecular Microbiology* 106, 530-542.
- Kokoeva, M.V., Storch, K.-F., Klein, C., and Oesterhelt, D. (2002).** A Novel Mode of Sensory Transduction in Archaea: Binding Protein-mediated Chemotaxis Towards Osmoprotectants and Amino Acids. *The EMBO Journal* 21, 2312-2322.
- Kruger, K., and Pfeifer, F. (1996).** Transcript Analysis of the c-vac Region and Differential Synthesis of the two Regulatory Gas Vesicle Proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarum* PHH4. *Journal of Bacteriology* 178, 4012-4019.
- Lakshmanan, A., Farhadi, A., Nety, S.P., Lee-Gosselin, A., Bourdeau, R.W., et al. (2016).** Molecular Engineering of Acoustic Protein Nanostructures. *ACS Nano* 10, 7314-7322.
- Lakshmanan, A., Lu, G.J., Farhadi, A., Nety, S.P., Kunth, M., et al. (2017).** Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI. *Nature Protocols* 12, 2050-2080.
- Lam, W.L., and Doolittle, W.F. (1989).** Shuttle Vectors for the Archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5478-5482.
- Lanyi, J.K. (1974).** Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria. *Bacteriological Reviews* 38, 272-290.
- Large, A., Stamme, C., Lange, C., Duan, Z., Allers, T., et al. (2007).** Characterization of a tightly Controlled Promoter of the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* and its Use in the Analysis of the Essential *cct1* Gene. *Molecular Microbiology* 66, 1092-1106.
- Levy, I., and Shoseyov, O. (2002).** Cellulose-Binding Domains. *Biotechnology Advances* 20, 191-213.
- Linder, M., and Teeri, T.T. (1997).** The Roles and Function of Cellulose-binding Domains. *Journal of Biotechnology* 57, 15-28.
- Liu, T.Y., Chou, W.C., Chen, W.Y., Chu, C.Y., Dai, C.Y., et al. (2018).** Detection of Membrane Protein-Protein Interaction in Planta based on Dual-Intein-Coupled Tripartite split-GFP Association. *The Plant Journal* 94, 426-438.
- Ludin, B., and Matus, A. (1998).** GFP Illuminates the Cytoskeleton. *Trend in Cell Biology* 8, 72-77.
- Lundqvist, M., Thalén, N., Volk, A.-L., Hansen, H.G., Von Otter, E., et al. (2019).** Chromophore Pre-Maturation for Improved Speed and Sensitivity of Split-GFP Monitoring of Protein Secretion. *Scientific Reports* 9.
- Madern, D., Ebel, C., and Zaccai, G. (2000).** Halophilic Adaptation of Enzymes. *Extremophiles* 4, 91-98.
- Madern, D., Pfister, C., and Zaccai, G. (1995).** Mutation at a Single Acidic Amino Acid Enhances the Halophilic Behaviour of Malate Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui* in Physiological Salts. *European Journal of Biochemistry* 230, 1088-1095.
- Magliery, T.J., Wilson, C.G.M., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., et al. (2004).** Detecting Protein-Protein Interactions with a Green Fluorescent Protein Fragment Reassembly Trap: Scope and Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 127, 146-157.
- Mandelli, F., Miranda, V.S., Rodrigues, E., and Mercadante, A.Z. (2012).** Identification of Carotenoids with High Antioxidant Capacity Produced by Extremophile Microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1781-1790.
- Marg, B.-L., Schweimer, K., Sticht, H., and Oesterhelt, D. (2005).** A Two- α -Helix Extra Domain Mediates the Halophilic Character of a Plant-Type Ferredoxin from Halophilic Archaea. *Biochemistry* 44, 29-39.
- Marschaus, L., and Pfeifer, F. (2012).** A Dual Promoter Region with Overlapping Activator Sequences Drives the Expression of Gas Vesicle Protein Genes in Haloarchaea. *Microbiology* 158, 2815-2825.

- Mcbee, R.H. (1954).** The Characteristics of *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology* 67, 505-506.
- Mevarech, M., Eisenberg, H., and Neumann, E. (1977).** Malate Dehydrogenase Isolated from Extremely Halophilic Bacteria of the Dead Sea. 1. Purification and Molecular Characterization. *Biochemistry* 16, 3781-3785.
- Mevarech, M., Leicht, W., and Werber, M.M. (1976).** Hydrophobic Chromatography and Fractionation of Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria Using Decreasing Concentration Gradients of Ammonium Sulfate. *Biochemistry* 15, 2383-2387.
- Morag, E., Lapidot, A., Govorko, D., Lamed, R., Wilchek, M., et al. (1995).** Expression, Purification, and Characterization of the Cellulose-Binding Domain of the Scaffoldin Subunit from the Cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Applied and environmental microbiology* 61, 1980-1986.
- Mullakhanbhai, M.F., and Larsen, H. (1975).** *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea *Halobacterium* with a Moderate Salt Requirement. *Archives of Microbiology* 104, 207-214.
- Müller, J.A., and Dassarma, S. (2005).** Genomic Analysis of Anaerobic Respiration in the Archaeon *Halobacterium* sp. Strain NRC-1: Dimethyl Sulfoxide and Trimethylamine N-Oxide as Terminal Electron Acceptors. *Journal of Bacteriology* 187, 1659-1667.
- Musillo, M. (2017).** Analyse von GvpM- und GvpJ-Mutanten von *Halobacterium salinarum*. *Bachelorthesis*, TU Darmstadt.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., et al. (2002).** A Variant of Yellow Fluorescent Protein with Fast and Efficient Maturation for Cell-biological Applications. *Nature Biotechnology* 20, 87-90.
- Nakano, M., Arai, Y., Kotera, I., Okabe, K., Kamei, Y., et al. (2017).** Genetically Encoded Ratiometric Fluorescent Thermometer with wide Range and Rapid Response. *PLoS ONE* 12, e0172344.
- Oesterhelt, D. (1998).** The Structure and Mechanism of the Family of Retinal Proteins from Halophilic Archaea. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 489-500.
- Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1971).** Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biology* 233, 149-152.
- Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1973).** Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 2853-2857.
- Offner, S., Hofacker, A., Wanner, G., and Pfeifer, F. (2000).** Eight of Fourteen *gvp* Genes Are Sufficient for Formation of Gas Vesicles in Halophilic Archaea. *Journal of Bacteriology* 182, 4328-4336.
- Offner, S., and Pfeifer, F. (1995).** Complementation Studies with the Gas Vesicle-encoding p-vac Region of *Halobacterium salinarum* PHH1 Reveal a Regulatory Role for the p-*gvpDE* Genes. *Molecular Microbiology* 16, 9-19.
- Offner, S., Wanner, G., and Pfeifer, F. (1996).** Functional Studies of the *gvpACNO* Operon of *Halobacterium salinarum* Reveal that the GvpC Protein Shapes Gas Vesicles. *Journal of Bacteriology* 178, 2071-2078.
- Offner, S., Ziese, U., Wanner, G., and Typke, D. (1998).** Structural Characteristics of Halobacterial Gas Vesicles. *Microbiology* 144, 1331-1342.
- Oren, A. (1999).** Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 334-348.
- Oren, A. (2013).** The Function of Gas Vesicles in Halophilic Archaea and Bacteria: Theories and Experimental Evidence. *Life* 3, 1-20.
- Ortenberg, R., and Mevarech, M. (2000).** Evidence for Post-translational Membrane Insertion of the Integral Membrane Protein Bacterioopsin Expressed in the Heterologous Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 275, 22839-22846.

- Ortenberg, R., Rozenblatt-Rosen, O., and Mevarech, M. (2002). The Extremely Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* has two very Different Dihydrofolate Reductases. *Molecular Microbiology* 35, 1493-1505.
- Palmer, B.R., and Marinus, M.G. (1994). The *dam* and *dcm* Strains of *Escherichia coli* - a Review. *Gene* 143, 1-12.
- Pfeifer, F. (2012). Distribution, Formation and Regulation of Gas Vesicles. *Nature Reviews Microbiology* 10, 705-715.
- Pfeifer, F., and Ghahraman, P. (1993). Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarum*: Characterization of the Replicon Region, the Gas Vesicle Gene Cluster and Insertion Elements. *Molecular and General Genetics* 238, 193-200.
- Pfeifer, F., Griffig, J., and Oesterhelt, D. (1993). The *fdx* Gene Encoding the [2Fe-2S] Ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *Molecular Genetics and Genomics* 239, 66-71.
- Pfeifer, F., Kruger, K., Röder, R., Mayr, A., Ziesche, S., et al. (1997). Gas Vesicle Formation in Halophilic Archaea. *Archives of Microbiology* 167, 259-268.
- Pfeifer, F., Offner, S., Krüger, K., Ghahraman, P., and Englert, C. (1994). Transformation of Halophilic Archaea and Investigation of Gas Vesicle Synthesis. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 569-577.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M., and Herzberg, O. (1998). Structural Features of Halophilicity Derived from the Crystal Structure of Dihydrofolate Reductase from the Dead Sea Halophilic Archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* 6, 75-88.
- Pire, C., Esclapez, J., Ferrer, J., and Bonete, M.Ì.a.-J. (2001). Heterologous Overexpression of Glucose Dehydrogenase from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*, an Enzyme of the Medium Chain Dehydrogenase/Reductase Family. *FEMS Microbiology Letters* 200, 221-227.
- Poole, D.M., Morag, E., Lamed, R., Bayer, E.A., Hazlewood, G.P., et al. (1992). Identification of the Cellulose-binding Domain of the Cellulosome Subunit S1 from *Clostridium thermocellum* YS. *FEMS Microbiology Letters* 99, 181-186.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary Structure of the *Aequorea victoria* Green-fluorescent Protein. *Gene* 111, 229-233.
- Rao, J.K., and Argos, P. (1981). Structural Stability of Halophilic Proteins. *Biochemistry* 20, 6536-6543.
- Reuter, C.J., and Maupin-Furlow, J.A. (2004). Analysis of Proteasome-dependent Proteolysis in *Haloferax volcanii* Cells, Using Short-Lived Green Fluorescent Proteins. *Applied and environmental microbiology* 70, 7530-7538.
- Roder, R., and Pfeifer, F. (1996). Influence of Salt on the Transcription of the Gas-vesicle Genes of *Haloferax mediterranei* and Identification of the Endogenous Transcriptional Activator Gene. *Microbiology* 142, 1715-1723.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction. *Nature Protocols* 5, 725-738.
- Ruepp, A., and Soppa, J. (1996). Fermentative Arginine Degradation in *Halobacterium salinarum* (Formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Gene Products, and Transcripts of the *arcRACB* Gene Cluster. *Journal of Bacteriology* 178, 4942-4947.
- Sambrook, J., and Russell, R.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition.
- Schagger, H., and Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium Dodecylsulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Scheuch, S., Marschhaus, L., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2008). Regulation of *gvp* Genes Encoding Gas Vesicle Proteins in Halophilic Archaea. *Archives of Microbiology* 190, 333-339.

- Scheuch, S., and Pfeifer, F. (2007).** GvpD-induced Breakdown of the Transcriptional Activator GvpE of Halophilic Archaea Requires a Functional p-loop and an Arginine-rich Region of GvpD. *Microbiology* 153, 947-958.
- Schlesner, M., Miller, A., Besir, H., Aivaliotis, M., Streif, J., et al. (2012).** The Protein Interaction Network of a Taxis Signal Transduction System in a Halophilic Archaeon. *BMC Microbiology* 12, 1-20.
- Schmidt, I., and Pfeifer, F. (2013).** Use of GFP-GvpE Fusions to Quantify the GvpD-mediated Reduction of the Transcriptional Activator GvpE in Haloarchaea. *Archives of Microbiology* 195, 403-412.
- Scholz, O., Thiel, A., Hillen, W., and Niederweis, M. (2000).** Quantitative Analysis of Gene Expression with an Improved Green Fluorescent Protein. *European Journal of Biochemistry* 267, 1565-1570.
- Shapiro, M.G., Goodwill, P.W., Neogy, A., Yin, M., Foster, F.S., et al. (2014a).** Biogenic Gas Nanostructures as Ultrasonic Molecular Reporters. *Nature Nanotechnology* 9, 311-316.
- Shapiro, M.G., Ramirez, R.M., Sperling, L.J., Sun, G., Sun, J., et al. (2014b).** Genetically Encoded Reporters for Hyperpolarized Xenon Magnetic Resonance Imaging. *Nature Chemistry* 6, 629-634.
- Shear, H., and Walsby, A.E. (1975).** An Investigation Into the Possible Light-shielding Role of Gas Vacuoles in a Planktonic Blue-green Alga. *British Phycological Journal* 10, 241-251.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962).** Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59, 223-239.
- Shukla, H.D., and Dassarma, S. (2004).** Complexity of Gas Vesicle Biogenesis in *Halobacterium* sp. Strain NRC-1: Identification of Five New Proteins. *Journal of Bacteriology* 186, 3182-3186.
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996).** Mutations That Suppress the Thermosensitivity of Green Fluorescent Protein. *Current Biology* 6, 1653-1663.
- Sivertsen, A.C., Bayro, M.J., Belenky, M., Griffin, R.G., and Herzfeld, J. (2010).** Solid-State NMR Characterization of Gas Vesicle Structure. *Biophysical Journal* 99, 1932-1939.
- Soboleski, M.R. (2004).** Green Fluorescent Protein is a Quantitative Reporter of Gene Expression in Individual Eukaryotic Cells. *National Institute of Health* 19, 440-442.
- Soppa, J. (2011).** Ploidy and Gene Conversion in Archaea. *Biochemical Society Transactions* 39, 150-154.
- Soppa, J., and Link, T.A. (1997).** The TATA-box-binding protein (TBP) of *Halobacterium salinarum* - Cloning of the *tbp* Gene, Heterologous Production of TBP and Folding of TBP into a Native Conformation. *European Journal of Biochemistry* 249, 318-324.
- Sorokin, D.Y., Messina, E., Smedile, F., Roman, P., Damsté, J.S.S., et al. (2017).** Discovery of Anaerobic Lithoheterotrophic Haloarchaea, Ubiquitous in Hypersaline Habitats. *The ISME journal* 11, 1245-1260.
- Sremac, M., and Stuart, E.S. (2008).** Recombinant Gas Vesicles from *Halobacterium* sp. Displaying SIV Peptides Demonstrate Biotechnology Potential as a Pathogen Peptide Delivery Vehicle. *BMC Biotechnology* 8, 1-14.
- Sremac, M., and Stuart, E.S. (2010).** SIVsm Tat, Rev, and Nef1: Functional Characteristics of r-GV Internalization on Isotypes, Cytokines, and Intracellular Degradation. *BMC Biotechnology* 10, 1-16.
- Stretton, S., Techkarnjanaruk, S., McLennan, A.M., and Goodman, A.E. (1998).** Use of Green Fluorescent Protein to Tag and Investigate Gene Expression in Marine Bacteria. *Applied and environmental microbiology* 64, 2554-2559.
- Strunk, T., Hamacher, K., Hoffgaard, F., Engelhardt, H., Zillig, M.D., et al. (2011).** Structural Model of the Gas Vesicle Protein GvpA and Analysis of GvpA Mutants *in vivo*. *Molecular Microbiology* 81, 56-68.

- Stuart, E.S., Morshed, F., Sremac, M., and Dassarma, S. (2001). Antigen Presentation Using Novel Particulate Organelles from Halophilic Archaea. *Journal of Biotechnology* 88, 119-128.
- Stuart, E.S., Morshed, F., Sremac, M., and Dassarma, S. (2004). Cassette-based Presentation of SIV Epitopes with Recombinant Gas Vesicles from Halophilic Archaea. *Journal of Biotechnology* 114, 225-237.
- Subach, O.M., Gundorov, I.S., Yoshimura, M., Subach, F.V., Zhang, J., et al. (2008). Conversion of Red Fluorescent Protein into a Bright Blue Probe. *Chemistry & Biology* 15, 1116-1124.
- Tavlaridou, S., Faist, K., Weitzel, K., and Pfeifer, F. (2013). Effect of an Overproduction of Accessory Gvp Proteins on Gas Vesicle Formation in *Haloferax volcanii*. *Extremophiles* 17, 277-287.
- Tavlaridou, S., Winter, K., and Pfeifer, F. (2014). The Accessory Gas Vesicle Protein GvpM of Haloarchaea and its Interaction Partners during Gas Vesicle Formation. *Extremophiles* 18, 693-706.
- Tomme, P., Gilkes, N.R., Guarna, M.M., Haynes, C.A., Hasenwinkle, D., et al. (1996a). Cellulose-binding Domains. *Annals New York Academy of Sciences* 799, 418-424.
- Tomme, P., Warren, R.a.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G., and Gilkes, N.R. (1996b). "Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties," in *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*. ACS Symposium, 142-163.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., et al. (1996). Crystal Structure of a Bacterial Family-III Cellulose-binding Domain: a General Mechanism for Attachment to Cellulose. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 15, 5739-5751.
- Von Hippel, P.H., and Schleich, T. (1969). Ion Effects on the Solution Structure of Biological Macromolecules. *Accounts of Chemical Research* 2, 257-265.
- Waaland, J.R., and Branton, D. (1969). Gas Vacuole Development in a Blue-Green Alga. *Science* 163, 1339-1341.
- Walsby, A.E. (1972). Structure and Function of Gas Vacuoles. *Bacteriol Rev* 36, 1-32.
- Walsby, A.E. (1994). Gas Vesicles. *Microbiological Reviews* 58, 94-144.
- Walsby, A.E., and Fogg, G.E. (1969). The Permeability of Blue-green Algal Gas-vacuole Membranes to Gas. *Proceedings of the Royal Society of London* 173, 235-255.
- Walsby, A.E., and Hayes, P.K. (1988). The Minor Cyanobacterial Gas Vesicle Protein, GVPc, is Attached to the Outer Surface of the Gas Vesicle. *Microbiology* 134, 2647-2657.
- Winter, K., Born, J., and Pfeifer, F. (2018). Interaction of Haloarchaeal Gas Vesicle Proteins Determined by Split-GFP. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-11.
- Xu, B.Y., Dai, Y.N., Zhou, K., Liu, Y.T., Sun, Q., et al. (2014). Structure of the Gas Vesicle Protein GvpF from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Biological Crystallography* 70, 3013-3022.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., et al. (2015). The I-TASSER Suite: Protein Structure and Function Prediction. *Nature Methods* 12, 7-8.
- Yang, L., Liu, A., Cao, S., Putri, R.M., Jonkheijm, P., et al. (2016). Self-Assembly of Proteins: Towards Supramolecular Materials. *Chemistry – A European Journal* 22, 15570-15582.
- Yao, V.J., and Spudich, J.L. (1992). Primary Structure of an Archaeobacterial Transducer, a Methyl-accepting Protein Associated with Sensory Rhodopsin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 11915-11919.
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N., and Eisenberg, H. (1989). Stabilization of Halophilic Malate Dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology* 208, 491-500.
- Zaccai, G., and Eisenberg, H. (1990). Halophilic Proteins and the Influence of Solvent on Protein Stabilization. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 333-337.
- Zhang, W., Brooun, A., Mueller, M.M., and Alam, M. (1996). The Primary Structures of the Archaeon *Halobacterium salinarum* Blue Light Receptor Sensory Rhodopsin II and its Transducer, a

Methyl-accepting Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8230-8235.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 1-8.

Zimmermann, P., and Pfeifer, F. (2003). Regulation of the Expression of Gas Vesicle Genes in *Haloferax mediterranei*: Interaction of the two Regulatory Proteins GvpD and GvpE. *Molecular Microbiology* 49, 783-794.

9. ANHANG

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete synthetische Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'	Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'
Herstellung von pCBD		Herstellung der split-GFP Vektoren	
5'BamHI-CBD	AGGTCAAGGATCCATGTTAAATACACCGGTATCAG	3'BamHI-pl*	AGGTCAAGGATCCCCCTCGTCTCAGTGGACTC
3'KpnI-Stop-XbaI-CBD	TGTTGTTGGTACCTCATCTAGAAATGACCTCCTACTACACTGC	5'XbaI-pJ	AGTTCTTCTAGAATGAGTGACCCCAAACCGAC
Herstellung von pJAS-NGFP und pWL-CGFP		3'KpnI-pJ	GGTACCTCATTTGGTCTCCTCCGCTG
5' BspHI-His-NGFP	AATAATTCATGAGCGCTCATCACCACCATCACCACGGCGAGTAAAGGAGAA GAACTTTCACTGG	5'BspHI-pJ	ACTGACTCATGAGTGACCCCAAACCG
3' BspI-Link-NGFP	TTATTAGCTCAGCGATTGGCCATGGCCGAGCCAGAGCCAGGCCACCTTGTTT GTCTGCCGTGATGTATAC	3'BamHI-pJ*	AGGTCAAGGATCCCCTTTGGTCTCCTCCG
5' NcoI-link-CGFP:	AATAATCCATGGCTAATGCATGCAATGGGATCCTGGGTGGAAGCGGTAAAGAA GGAATCAAAGCTAACTTC	5'XbaI-pK	AGTTCTTCTAGAATGGAAGTACGACTCGACGAC
3' KpnI-CGFP	ATTATTGGTACCTTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCATGTGTAATCC	3'KpnI-pK	AGTTCTGGTACCTCATACGTCATCAGCTGGG
Inserierung der gvp-Leserahmen in den Vektor pCBD		5'NcoI-pK	ACACGACCATGGAACTAGCACTCGACGAC
5'XbaI-pF	AGTTCTTCTAGAATGACTGAGAACCTATACACATACGG	3'BamHI-pK*	AGGTCAAGGATCCCCTACGTCATCAGCTGGGATTC
3'KpnI-pF	AGTTCTGGTACCTTATCGGCCCTCCTTGTGCTGTC	5'XbaI-pL	AGTTCTTCTAGAATGACTGACCAACCGGCCAG
5'BspHI-pF	ACACGATCATGACTGAGAACCTATACACATACGGTATCATC	3'KpnI-pL	AGTTCTGGTACCTTATTTACCAATATCTGGCGCG
3'BamHI-pF*	AGGTCAAGGATCCCCTCGGCCTCCTTTGTTGCTG	5'BspHI-pL	TGTTGTTTCTAGACTGACCAACCGGCC
5'XbaI-pG	AGTTCTTCTAGAATGTTTCATCATAGACGATCTCTTCG	3'BamHI-pL*	AGGTCAAGGATCCCCTTTACCAATATCTGGCGC
3'KpnI-pG	AGTTCTGGTACCTTATTTCTTGACCTCCATGCGG	5'XbaI-pM	AGTTCTTCTAGAATGGAGCCAAACAAAGACGAGACAC
5'PciI-pG	TCCGAGACATGTTTCATCATAGACGATCTC	3'KpnI-pM	AGTTCTGGTACCTCAGTCTCTCGCCGATC
3'BamHI-pG*	AGGTCAAGGATCCCCTTTCTTGACCTCCATGC	5'NcoI-pM	GCGCTACCATGGAGCCAAACAAAGACG
5'XbaI-pH	AGTTCTTCTAGAATGGTTCCCGACGAAAAACG	3'BamHI-pM*	AGGTCAAGGATCCCCGCTCTCTCGCCG
3'KpnI-pH	GGTACCTCATGTGGATTACCTCCATCG	Herstellung der split-GFP Vektoren	
5'NcoI-pH	ACACGACCATGGTTCCCGACGAAAAACGACGA	5'BspHI-NGFP	TCATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTCACTG
3'BamHI-pH*	AGGTCAAGGATCCCCCTGTGGATTACCTCCATCGG	3' BspI-space-NGFP	GCTCAGCGATTGGCCATGGCCGAGCCAGAGCCACCCGAGCCAGAGCCAGCCACC TTGTTGTCTGCCGTG
5'XbaI-pl	AGTTCTTCTAGAATGAGCGACAAACAGCAAAAAAC	5'NcoI/BspI-link-NGFP IIb	CCATGGCCAATCGCTGAGCGGTGGCTCTGGCTCTGGCTCGGGTGGCTCTGGCTCTGGCTCGGG GATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTCACTGGA
3'KpnI-pl	AGTTCTGGTACCTACCTCGTCTCAGTGG	3'KpnI-NGFP IIb	GGTACCTCATTTGTTGCTGCCGTGATGTATACGTTGTG
5'BspHI-pl	TGTTGTTTCTAGAGCGCAAAACACAGCAAAAAACACAAG	5'NcoI-space-CGFP	CCATGGCTAATGCATGCAATGGGATCCTGGGTGGAAGCGGTGGTGGAAAGCGGTGGTGGAAAGCG GTGGTGGAAAGCGGTAAAGATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTAG
		3'KpnI-CGFP	ATTATTGGTACCTTATTTGTATAGTTTCATCCATGCCATGTGTAATCC
		5'NcoI-CGFP IIb	CCATGGATGAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTAGACACAACATTG

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete synthetische Oligonukleotide (Fortsetzung).

Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'	Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'
fwd-25N-NIib	TCGCTGAGCGGTGGC	5'-NcoI-pK	ACACGA CCATGG AACTAGCACT CGACGAC
fwd-25N-CIla	GGGATCCTGGGTGGAAG	3'-BipI-pK	TGTTGTT GCTCAGC TCATACGTCATCACGCTGGGATTC
fwd-25N-CIib	TGAGGTACCGCGTGTGAAG	5'-BspHI-pL	TGTTGTT TCATGA CTGACCACCGGCC
rev-25N	AATCACGGCTCCGTCCG	3'-BipI-pL	TGTTGTT GCTCAGC TTATTTACCA ATATCTGGCG
fwd-25C	GAGGAGTGGGATGCTGC	5'-HindIII-pH	ATTC AAGCTT ATGGTACCCGACGAAAACGAC
rev-25N-NIla	CATGGCCGAGCCAGAG	3'-SpeI-pH	ATTC ACTAGT TCATGTGGATTACCTCCATCG
rev-25C-NIib/CIla	CATGGGCATCACTGCAGAG	5'-HindIII-pG	ATTC AAGCTT ATGTTTCATAGACGATCTCTTCG
rev-25C-CIib	CATGGATCCACCGCTTCC	5'-HindIII-pF	ATTC AAGCTT ATGACTGAGAACCTATACACATACG
5'-NcoI-pM	GCGCTACCATGAGCCAACAAAAGACG	3'-SpeI-pL	ATTC ACTAGT TTATTTACCAATATCTGGCGCAAC
3'-BipI-M(1-61)	TGTTGTTGCTCAGCTCACTCCGGAACAGGCCG	3'-SpeI-pK	ATTC ACTAGT TCATACGTCATCACGCTGG
3'-BipI-M(1-61)*	TGTTGTTGCTCAGCCCTCCTCGAACAGGCCG		
5'-BamHI-pM	AGGTCAAGGATCCATGGAGCCAACAAAAG	Inserierung der GvpM-Deletionsvarianten in pWL-CGFP-Cterm	
3'-KpnI-M(1-61)	AGTTCTGGTACCTCACTCCTCGAACAGGCC	5'-NcoI-Mdel5N	GCGCTACCATGAGCAGACACACG
3'-BamHI-M(1-61)*	AGGTCAAGGATCCCTCCTCGAACAGGCCG	5'-BspHI-Mdel10N	GCATCGTCATGATCGTTGAGTTCTGTCG
3'-BipI-M(1-45)	TGTTGTTGCTCAGCTCATGCCGGGAGGCTG	5'-NcoI-Mdel20N	TGTACGCCATGACGGAGCCG
3'-BipI-M(1-45)*	TGTTGTTGCTCAGCCCTGCCCGGAGGCTG	3'-BamHI-pM*	AGTTCTGGATCCCGTCTCTCGCCG
3'-KpnI-M(1-45)	AGTTCTGGTACCTCATGCCGGGAGGCTG	5'-NcoI-pM	GCGCT CCATGGAGCCAACAAAAGACG
3'-BamHI-M(1-45)*	AGGTCAAGGATCCCTGCCCGGAGGCTG	3'-BamHI-Mdel10C*	AGGTCAAGGATCCCGTGAACGCTTCGCTC
5'-NcoI-M(22-48)	ACACGACCATGGGAGCCGTGATTCAAGC	3'-BamHI-Mdel15C*	AGGTCAAGGATCCCGTGTGTCGATGCGCAG
3'-BipI-M(22-48)	TGTTGTTGCTCAGCTCAAGCAATCGCTGCCCG	3'-BamHI-Mdel20C*	AGGTCAAGGATCCCGATCCCACCTCTCG
3'-BipI-M(22-48)*	TGTTGTTGCTCAGCCAGCAATCGCTGCCCG	3'-BamHI-Mdel25C*	AGGTCAAGGATCCCGAACAGGCCGTACTCC
5'-BamHI-M(22-48)	AGGTCAAGGATCCGGAGCCGTGATTCAAGC	3'-BamHI-Mdel27C*	AGGTCAAGGATCCCGCGGTACTCCGTCATG
3'-KpnI-M(22-48)	AGTTCTGGTACCTCAAGCAATCGCTGCCCG	3'-BamHI-Mdel29C*	AGGTCAAGGATCCCGTCCGTCATGGTGGTCAATG
3'-BamHI-M(22-48)*	AGGTCAAGGATCCAGCAATCGCTGCCCG	3'-BamHI-Mdel30C*	AGGTCAAGGATCCCGTCAATGGTGGTCAATG
Inserierung in den Vektor pP2-NGFP-Nterm		Mutagenese von pM^{ex}	
5'-BspHI-pF	ACACGA TCATGA CTGAGAACCTATACACATACGGTATCATC	5'-M(E02A)	ATGGcaCCAACAAAAGACGAG
3'-BipI-pF	ATTC GCTCAGC TTATCGGCCTCCTGTTGCTGTTC	5'-M(P03A)	ATGgAGGCAACAAAAGACGAG
5'-PciI-pG	TCCGAG ACATGT TCATCATAGACGATCTC	5'-M(T04A)	ATGGAGCCAACAAAAGACGAG
3'-BipI-pG	TGTTGTT GCTCAGC TTATTTCTTGACCTCCATGCG	5'-M(K05A)	ATGGAGCCAACAgcAGACGAG
5'-BspHI-pl	TGTTGTT TCATGA GCGACAAACACAGCAAAAACACAAG	5'-M(D06A)	ATGGAGCCAACAAAAGcCGAG
3'-BipI-pl	ATTC GCTCAGC TCACCTGTCCTCAGTGCG	5'-M(E07K)	GACaAGACACACGCGATCGTT
5'-BspHI-pJ	ACTGAC TCATGA GTGACCCCAACCCG	5'-M(T08A)	GACGAGgCACACGCGATCGTT
3'-BipI-pJ	GTAACCT GCTCAGC TCATTTGGTCTCTCCG	5'-M(H09A)	GACGAGACAgcCGCGATCGTT

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete synthetische Oligonukleotide (Fortsetzung).

Bezeichnung	Sequenz 3' → 5'
5'M(A10D)	GACGAGACACAGacATCGTT
5'M(I11A)	GCGgcCGTTGAGTTCGT
5'M(I11D)	GCGgaCGTTGAGTTCGT
5'M(V12Y)	GCGATCtaTGAGTTCGT
5'M(F14A)	GCGATCGTTGAGgcCGT
5'M(V15A)	TTCGcCGACGTGTTACTGC
5'M(V17A)	TTCGTCGACGcGTTACTGC
5'M(L18A)	TTCGTCGACGTGgcACTGC
5'M(L19A)	TTCGTCGACGTGTTAgcGC
5'M(G22A)	GACGcAGCCGTGATTCAAG
5'M(V24A)	GACGGAGCCgcGATTCAAG
5'M(I25A)	GACGGAGCCGTGgcTCAAG
3'M(mut)-1	CTGCAGAGTTCGGCTTCC
3'M(mut)-2	TTTTGTTGGCTCCATCTGCAGAG
3'M(mut)-3	GTGTGTCTCGTCTTTGTTGGCTC
3'M(mut)-4	CTCAACGATCGCGTGTGTCTC
3'M(mut)-5	GCGCAGTAACACGTCGAC

Inserierung der *M*(25N-mut)-Leserahmen in pJAS-NGFP-Cterm

5'NcoI-pM(K05A)	GCGCTA <u>CCATG</u> GAGCCAACAgcAGAC
5'NcoI-pM(D06A)	GCGCTA <u>CCATG</u> GAGCCAACAAAAGcC
5'NcoI-pM	GCGCTA <u>CCATG</u> GAGCCAACAAAAGACG
3'BipI-pM(25N)	TGTTGTT <u>GCTCAG</u> CCCAATCAGCGCTCCGTCG
3'BipI-pM(25N-D21A)	TGTTGTT <u>GCTCAG</u> CCCAATCAGCGCTCCGgc
3'BipI-pM(25N-G22A)	TGTTGTT <u>GCTCAG</u> CCCAATCAGCGCTgCGTC
3'BipI-pM(25N-A23D)	TGTTGTT <u>GCTCAG</u> CCCAATCAGCTCTCCGTCGC
3'BipI-pM(25N-V24A)	TGTTGTT <u>GCTCAG</u> CCCAATcgCGGCTCCGTC
3'BipI-pM(25N-I25A)	TGTTGTT <u>GCTCAG</u> CCCAgcCACGGCTCCG

Inserierung der *gvpM*mut-Leserahmen in pWL-CGFP-Cterm

5'NcoI-pM	GCGCTA <u>CCATG</u> GAGCCAACAAAAGACG
3'BamHI-pM*	AGTTCTGGATCCCGTCC7CTCGCCG

* das Stopcodon wurde aus den *gvp*-Leserahmen deletiert

unterstrichen: Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen

kursiv: Annealing-Bereich

fett: Linker-Region als Überhangsequenz

Aminosäuresubstitutionen sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte.

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pF x pET28a	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Kerstin Winter, Masterthesis (2015)
pG x pET28a	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Ahmet Mert, Diplomarbeit (2016)
pH x pET28a	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2014
pI x pET28a	Enthält den p- <i>gvpI</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pJ x pET28a	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Stella Tavlaridou, Dissertation 2014
pK x pET28a	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pL x pET28a	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2014
pM x pET28a	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den His- <i>tag</i> -Expressionsvektor pET28a(+) inseriert wurde. Der 6xHis- <i>tag</i> befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2014
pF^{ex}	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>Nco</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
pG^{ex}	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>Pst</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
pH^{ex}	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>Nco</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
pI^{ex}	Enthält den p- <i>gvpI</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>Pst</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Alisa Jost, unveröffentlicht
pJ^{ex}	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>Nco</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
pK^{ex}	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>Pst</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Stella Tavlaridou, Dissertation 2014
pL^{ex}	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>Nco</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
pM^{ex}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>Nco</i> I und <i>Kpn</i> I in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurde.	Tavlaridou <i>et al.</i> , 2013
pF^{-L}^{ex}	Enthält die Leserahmen <i>gvpF</i> , <i>gvpG</i> , <i>gvpH</i> , <i>gvpI</i> , <i>gvpJ</i> , <i>gvpK</i> und <i>gvpL</i> (3397 bp), die über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III in den halobakteriellen <i>shuttle</i> -Vektor pJAS35 inseriert wurden.	Diese Arbeit
pCBD^F	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>Xba</i> I und <i>Kpn</i> I in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCBD^G	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>Xba</i> I und <i>Kpn</i> I in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCBD^H	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>Xba</i> I und <i>Kpn</i> I in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pH_{CBD}	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCBDI	Enthält den p- <i>gvpI</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	S. Leftheriotis, unveröffentlicht
pICBD	Enthält den p- <i>gvpI</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCBDJ	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pJCBD	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pCBDK	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pK_{CBD}	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCBDL	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pL_{CBD}	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCBDM	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>XbaI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM_{CBD}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pCBD inseriert wurde. Der <i>cbd</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pNA	Enthält den p- <i>gvpA</i> -Leserahmen (231 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pAN	Enthält den p- <i>gvpA</i> -Leserahmen (231 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCA	Enthält den p- <i>gvpA</i> -Leserahmen (231 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pAc	Enthält den p- <i>gvpA</i> -Leserahmen (231 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pNF	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pFN	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pCF	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pFc	Enthält den p- <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pNG	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
p_{G_N}	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{cG}	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{Gc}	Enthält den p- <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{NH}	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{H_N}	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{cH}	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{Hc}	Enthält den p- <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_{Nl}	Enthält den p- <i>gvpl</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	S. Leftheriotis, unveröffentlicht
p_{ln}	Enthält den p- <i>gvpl</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	S. Leftheriotis, unveröffentlicht
p_{cl}	Enthält den p- <i>gvpl</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	S. Leftheriotis, unveröffentlicht
p_{lc}	Enthält den p- <i>gvpl</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	S. Leftheriotis, unveröffentlicht
p_{NJ}	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
p_{J_N}	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
p_{cJ}	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
p_{Jc}	Enthält den p- <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
p_{NK}	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pK_N	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pC_K	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pK_C	Enthält den p- <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pN_L	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pL_N	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pC_L	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pL_C	Enthält den p- <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pN_M	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM_N	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pC_M	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM_C	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pN_M(1-61)	Enthält die Nukleotide 1-186 (Aminosäuren 1-61) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM₍₁₋₆₁₎N	Enthält die Nukleotide 1-186 (Aminosäuren 1-61) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pC_M(1-61)	Enthält die Nukleotide 1-186 (Aminosäuren 1-61) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM₍₁₋₆₁₎C	Enthält die Nukleotide 1-186 (Aminosäuren 1-61) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pN_M(1-45)	Enthält die Nukleotide 1-138 (Aminosäuren 1-45) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pM(1-45)_N	Enthält die Nukleotide 1-138 (Aminosäuren 1-45) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_CM(1-45)	Enthält die Nukleotide 1-138 (Aminosäuren 1-45) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(1-45)_C	Enthält die Nukleotide 1-138 (Aminosäuren 1-45) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_NM(25N)	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_CM(25N)	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N)_C	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_NM(22-48)	Enthält die Nukleotide 64-144 (Aminosäuren 22-48) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(22-48)_N	Enthält die Nukleotide 64-144 (Aminosäuren 22-48) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_CM(22-48)	Enthält die Nukleotide 64-144 (Aminosäuren 22-48) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(22-48)_C	Enthält die Nukleotide 64-144 (Aminosäuren 22-48) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_NM(25-59)	Enthält die Nukleotide 73-177 (Aminosäuren 25-59) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25-59)_N	Enthält die Nukleotide 73-177 (Aminosäuren 25-59) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_CM(25-59)	Enthält die Nukleotide 73-177 (Aminosäuren 25-59) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25-59)_C	Enthält die Nukleotide 73-177 (Aminosäuren 25-59) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_NM(25C)	Enthält die Nukleotide 178-255 (Aminosäuren 60-84) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pM(25C)_N	Enthält die Nukleotide 178-255 (Aminosäuren 60-84) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
p_cM(25C)	Enthält die Nukleotide 178-255 (Aminosäuren 60-84) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Nterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromaufwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25C)_c	Enthält die Nukleotide 178-255 (Aminosäuren 60-84) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pH_NF	Enthält den <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpF</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp) wurde über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> in den gleichen Vektor inseriert und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pH_NG	Enthält den <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>PciI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpG</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp) wurde über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> in den gleichen Vektor inseriert und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pH_NI	Enthält den <i>gvpI</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpI</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp) wurde über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> in den gleichen Vektor inseriert und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pH_NJ	Enthält den <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpJ</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp) wurde über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> in den gleichen Vektor inseriert und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pH_NK	Enthält den <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpK</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp) wurde über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> in den gleichen Vektor inseriert und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pH_NL	Enthält den <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpL</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpH</i> -Leserahmen (549 bp) wurde über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> in den gleichen Vektor inseriert und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pF-LΔF+N_F	Enthält den <i>gvpF</i> -Leserahmen (642 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpF</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpF</i> -LΔF-Leserahmen (2755 bp) enthält alle akzessorischen <i>gvp</i> -Gene, außer <i>gvpF</i> , und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Dieser wurde ebenfalls in den Vektor pP2-NGFP-Nterm über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> inseriert. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pF-LΔG+N_G	Enthält den <i>gvpG</i> -Leserahmen (252 bp), der über die Schnittstellen <i>PciI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpG</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpF</i> -LΔG-Leserahmen (3146 bp) enthält alle akzessorischen <i>gvp</i> -Gene, außer <i>gvpG</i> , und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Dieser wurde ebenfalls in den Vektor pP2-NGFP-Nterm über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> inseriert. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pF-LΔI+N_I	Enthält den <i>gvpI</i> -Leserahmen (435 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tax}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpI</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpF</i> -LΔI-Leserahmen (2962 bp) enthält alle akzessorischen <i>gvp</i> -Gene, außer <i>gvpI</i> , und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Dieser wurde ebenfalls in den Vektor pP2-NGFP-Nterm über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> inseriert. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pF- Δ J+ Δ NJ	Enthält den <i>gvpJ</i> -Leserahmen (345 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tdk}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpJ</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpF-ΔJ</i> -Leserahmen (3052 bp) enthält alle akzessorischen <i>gvp</i> -Gene, außer <i>gvpJ</i> , und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Dieser wurde ebenfalls in den Vektor pP2-NGFP-Nterm über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> inseriert. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pF- Δ K+ Δ NK	Enthält den <i>gvpK</i> -Leserahmen (342 bp), der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tdk}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpK</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpF-ΔK</i> -Leserahmen (3055 bp) enthält alle akzessorischen <i>gvp</i> -Gene, außer <i>gvpK</i> , und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Dieser wurde ebenfalls in den Vektor pP2-NGFP-Nterm über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> inseriert. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pF- Δ L+ Δ NL	Enthält den <i>gvpL</i> -Leserahmen (846 bp), der über die Schnittstellen <i>BspHI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pP2-NGFP-Nterm inseriert wurde und unter der Kontrolle des <i>P_{tdk}</i> -Promotors steht. Der <i>gvpL</i> -Leserahmen ist N-terminal mit dem <i>ngfp</i> -Leserahmen fusioniert. Der <i>gvpF-ΔL</i> -Leserahmen (2551 bp) enthält alle akzessorischen <i>gvp</i> -Gene, außer <i>gvpL</i> , und steht unter der Kontrolle des <i>P2</i> -Promotors. Dieser wurde ebenfalls in den Vektor pP2-NGFP-Nterm über die Schnittstellen <i>HindIII</i> und <i>SpeI</i> inseriert. Beide Leserahmen wurden <i>in cis</i> exprimiert.	Phillipp Bauer und Ezgi Sari, unveröffentlicht
pM(Δ 5N) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (240 bp) mit einer N-terminalen Deletion von 5 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 10N) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (225 bp) mit einer N-terminalen Deletion von 10 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 20N) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (195 bp) mit einer N-terminalen Deletion von 20 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 10C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (222 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 10 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 15C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (208 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 15 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 20C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (192 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 20 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 25C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (177 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 25 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 27C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (171 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 27 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 29C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (165 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 29 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(Δ 30C) _c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (162 bp) mit einer C-terminalen Deletion von 30 Aminosäuren, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pL-O	Enthält die p-vac Region aus <i>Hbt. salinarum</i> PHH1 mit deletiertem <i>gvpM</i> -Leserahmen inseriert in den Shuttle-Vektor pWL102. Zur Vereinfachung wird im Verlauf dieser Arbeit dieses Konstrukt ausschließlich Δ M genannt.	(Offner <i>et al.</i> , 2000)
pM _{E02A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Glutaminsäure zu Alanin an Position 2. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pM _{P03A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Glutaminsäure zu Prolin an Position 3. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{T04A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Threonin zu Alanin an Position 4. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{K05A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Lysin zu Alanin an Position 5. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{D06A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Asparaginsäure zu Alanin an Position 6. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{E07K}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Glutaminsäure zu Lysin an Position 7. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{T08A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Threonin zu Alanin an Position 8. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{H09A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Histidin zu Alanin an Position 9. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{A10D}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Alanin zu Asparaginsäure an Position 10. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{I11A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Isoleucin zu Alanin an Position 11. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{I11D}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Isoleucin zu Asparaginsäure an Position 11. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{V12Y}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Valin zu Tyrosin an Position 12. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{F14A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Phenylalanin zu Alanin an Position 14. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{V15A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Valin zu Alanin an Position 15. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{V17A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Valin zu Alanin an Position 17. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{L19A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Leucin zu Alanin an Position 19. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM _{G22A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Glycin zu Alanin an Position 22. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pM_{V24A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Valin zu Alanin an Position 24. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM_{I25A}	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Isoleucin zu Alanin an Position 25. Die Aminosäuren wurden mittels spezifischer Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize wurde das Konstrukt pM ^{ex} verwendet.	Diese Arbeit
pM(25N-E02A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Glutaminsäure zu Alanin an Position 2, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-P03A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Prolin zu Alanin an Position 3, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-T04A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Threonin zu Alanin an Position 4, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-K05A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Lysin zu Alanin an Position 5, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-D06A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Asparaginsäure zu Alanin an Position 6, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-E07K)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Glutaminsäure zu Lysin an Position 7, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-T08A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Threonin zu Alanin an Position 8, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-H09A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Histidin zu Alanin an Position 9, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-A10D)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Alanin zu Asparaginsäure an Position 10, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-I11A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Isoleucin zu Alanin an Position 11, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-I11D)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Isoleucin zu Asparaginsäure an Position 11, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-V12Y)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Valin zu Tyrosin an Position 12, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-E13A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Glutaminsäure zu Alanin an Position 13, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Modul MTB03 (2018), unveröffentlicht
pM(25N-F14A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Phenylalanin zu Alanin an Position 14, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pM(25N-V15A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Valin zu Alanin an Position 15, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-D16A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Asparaginsäure zu Alanin an Position 16, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-V17A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Valin zu Alanin an Position 17, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-L18A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Leucin zu Alanin an Position 18, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-L19A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Leucin zu Alanin an Position 19, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-R20A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Arginin zu Alanin an Position 20, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-D21A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Asparaginsäure zu Alanin an Position 21, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-G22A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Glycin zu Alanin an Position 22, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-A23D)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Alanin zu Asparaginsäure an Position 23, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-V24A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Valin zu Alanin an Position 24, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(25N-I25A)_N	Enthält die Nukleotide 1-75 (Aminosäuren 1-25) des p- <i>gvpM</i> -Leserahmens mit einer Substitution von Isoleucin zu Alanin an Position 25, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BlnI</i> in den Vektor pJAS-NGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>ngfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(V15E)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Valin zu Glutaminsäure an Position 15, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pM(L19E)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Leucin zu Glutaminsäure an Position 19, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pM(G22D)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Glycin zu Asparaginsäure an Position 22, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pM(A23D)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Alanin zu Asparaginsäure an Position 23, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pM(V24D)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Valin zu Asparaginsäure an Position 24, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte (Fortsetzung).

Konstrukt	Bemerkung	Referenz
pM(R44E)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Arginin zu Glutaminsäure an Position 44, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(A45E)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Alanin zu Glutaminsäure an Position 45, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht
pM(A46E)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Alanin zu Glutaminsäure an Position 46, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(I47A)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Isoleucin zu Alanin an Position 47, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	Diese Arbeit
pM(A48D)_c	Enthält den p- <i>gvpM</i> -Leserahmen (255 bp) mit einer Substitution von Alanin zu Asparaginsäure an Position 48, der über die Schnittstellen <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pWL-CGFP-Cterm inseriert wurde. Der <i>cgfp</i> -Leserahmen befindet sich stromabwärts des <i>gvp</i> -Leserahmens.	G. Thavayogarah, unveröffentlicht

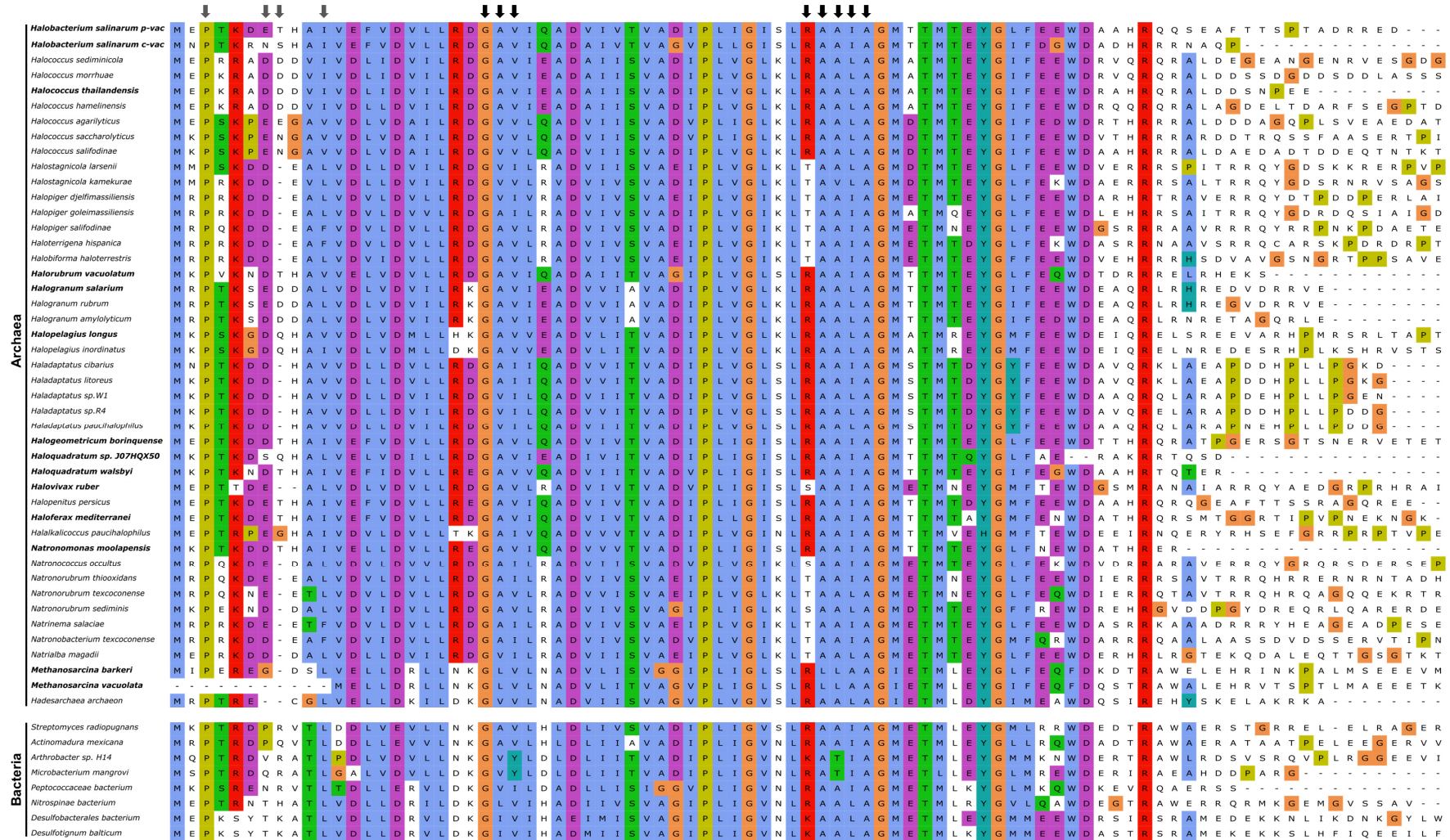


Abbildung 36: Aminosäurenalignment von GvpM unterschiedlicher Organismen. Fett markierte Organismen sind Gasvesikel-Produzenten. Organismen in normaler Schrift bilden entweder keine Gasvesikel aus oder dieses ist nicht bekannt bzw. noch nicht untersucht. Aminosäuren mit gleicher biochemischer Eigenschaft sind jeweils mit gleicher Farbe markiert. Dargestellt sind jeweils die ersten 86 aa der GvpM-Sequenzen. Die Pfeile markieren relevante Bereiche (grau: PETI-Motiv; schwarz: GAV/RAAIA-Motiv) in der GvpM-Sequenz der p-vac Region aus *Hbt. salinarum* PHH1.

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Microliter
µM	Micromolar
µm	Micrometer
aa	Aminosäure
APS	Adenosinphosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBD	Cellulose-Bindedomäne
CGFP	Aminosäure 158-238 von mGFP2
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDM	n-Dodecyl β-D-maltoside
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
fdx	Ferredoxin
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<i>gvp</i>	Gasvesikelprotein-Gen
Gvp	Gasvesikelprotein
h	Stunde
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAU/mm ²	<i>light arbitrary units</i> pro Quadratmillimeter
M	Molar
m	Meter

mg	Miligramm
min	Minute
mM	Milimolar
mm	Milimeter
MPa	Megapascal
mRNA	Messenger-Riboukleinsäure
mut	genetisch verändertes Gen oder Protein
ng	Nanogramm
NGFP	Aminosäure 1-157 von mGFP2
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OGP	Octyl β -D-glucopyranoside
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rf	relative Fluoreszenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Zimmertemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylaminoxid
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vac	Gasvesikelphänotyp
VM	Vollmedium
VMH	Vollmedium mit Histidin
w/v	Gewicht pro Volumen
wt bzw. WT	Wildtyp
Δ	Gendeletion

11. BEITRÄGE ANDERER

Die hier präsentierten Daten wurden von mir erstellt, analysiert und ausgewertet mit der Ausnahme von:

Kapitel 5.2.2

Die Konstrukte **p_{CBD}J** und **pJ_{CBD}** wurden von Gayathiri Thavayogarajah im Rahmen ihrer Bachelorarbeit (2017) unter meiner Leitung hergestellt und die Pulldown-Assays mit GvpM durchgeführt.

Das Konstrukt **p_{CBD}I** wurde von Sergios Leftheriotis im Rahmen seiner Bachelorarbeit (2018) unter meiner Leitung hergestellt und die Pulldown-Assays mit allen akzessorischen Gasvesikelproteinen durchgeführt.

Kapitel 5.3.6

Die Vektoren **pP2-NGFP-Nterm** und **pP2-NGFP-Cterm** wurden von Alisa Jost hergestellt.

Folgende Konstrukte wurden von Philipp Bauer und Ezgi Sari im Rahmen des Mastermoduls MTB03 unter meiner Leitung hergestellt und analysiert:

- | | | |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1. pH+N _F | 6. pH+N _L | 11. pF-LΔI+N _I |
| 2. pH+N _G | 7. pH+N _M | 12. pF-LΔJ+N _J |
| 3. pH+N _I | 8. pH+M _N | 13. pF-LΔL+N _L |
| 4. pH+N _J | 9. pF-LΔF+N _F | 14. pF-L+N _M |
| 5. pH+N _K | 10. pF-LΔG+N _G | 15. pF-L+N _N |

Kapitel 5.4.1

Die Deletionsvarianten **M(Δ15C)** und **M(Δ15C)** sowie die Punktmutanten **M(T32K)** und **M(I36M)** wurden von Petra Silvia Wurmser, Sebastian Kruse und Sonali Wohra im Rahmen des Masterpraktikums MTB03 unter meiner Leitung hergestellt und der Gasvesikel-Phänotyp untersucht.

Die Deletionsvarianten **M(Δ25C)**, **M(Δ27C)**, **M(Δ29C)** und **M(Δ30C)** wurde von Maria Musillo im Rahmen ihrer Bachelorthesis (2017) unter meiner Leitung hergestellt und ebenfalls der GV-Phänotyp untersucht.

Kapitel 5.4.2

Folgende Konstrukte wurden von Selina Börsig, Adrian Elter, Vanessa Fuchs, Annika Meffert und Marc Pfitzer im Rahmen des Mastermoduls MTB03 unter meiner Leitung hergestellt und analysiert:

- | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. pM(25N-E02A) _N | 6. pM(25N-E07K) _N | 11. pM(25N-I11D) _N |
| 2. pM(25N-P03A) _N | 7. pM(25N-T08A) _N | 12. pM(25N-V12Y) _N |
| 3. pM(25N-T04A) _N | 8. pM(25N-H09A) _N | 13. pM(25N-E13A) _N |
| 4. pM(25N-K05A) _N | 9. pM(25N-A10D) _N | |
| 5. pM(25N-D06A) _N | 10. pM(25N-I11A) _N | |

12. PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Winter, K., Born, J., & Pfeifer, F. (2018). Interaction of haloarchaeal gas vesicle proteins determined by split-GFP. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1897.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse wurden regelmäßig auf folgenden nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt:

Posterpräsentationen:

- Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Jena, 13. bis 16. März 2016
- Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Würzburg, 5. bis 8. März 2017
- Internationale Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Wolfsburg, 15. bis 18. April 2018
- Internationalen Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Mainz, 17. bis 20. März 2019

wissenschaftliche Vorträge:

- 18th Genome Function and Gene Regulation in Archaea in Schmittgen, 18. bis 19. Sept. 2017
- 19th Genome Function and Gene Regulation in Archaea in Schmittgen, 16. bis 17. Juli 2018

13. CURRICULUM VITAE

Name: Kerstin Völkner, geb. Winter

Geburtsdatum: 20.12.1988

Geburtsort: Groß-Gerau

Akademische Ausbildung

07/2015 - 06/2019

Doktorandin an der Technischen Universität Darmstadt
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. rer. nat. Felicitas Pfeifer

Titel der Dissertation: *In vivo* und *in vitro* Interaktionen haloarchaealer
Gasvesikelproteine

04/2013 - 09/2015

Studium **Technische Biologie**, Technische Universität Darmstadt
Abschluss: Master of Science (M. Sc.)

Titel der Masterarbeit: Interaktion von akzessorischen
Gasvesikelproteinen bei der Gasvesikelbildung in Haloarchaea

10/2009 - 03/2013

Studium Biologie, Technische Universität Darmstadt
Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)

Titel der Bachelorarbeit: Untersuchung von GvpM-Mutanten in
Haloferax volcanii

Schulische Ausbildung

1999 - 2009

Abitur am Max-Planck-Gymnasium, Rüsselsheim
Leistungskurse: Biologie und Mathematik

14. DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer für das überaus interessante Thema, die gute Betreuung und die zahllosen guten und ausgiebigen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Dabei habe ich sehr viel gelernt. Auch bedanke ich mich bei ihr, dass ich mich in meiner Arbeit frei entfalten und ausprobieren durfte.

Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin danke ich für viele wissenschaftliche Denkanstöße und Ratschläge und das Übernehmen des Zweitgutachtens.

Auch bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jerry Eichler von der Ben-Gurion University of the Negev für die Bereitstellung der Cellulose-Bindedomäne.

Ein ganz besonderer Dank geht an die gesamten Arbeitsgruppen Pfeifer, Kletzin und Simon. Ohne euch wäre der Laboralltag nicht annähernd so lustig gewesen! Die gemeinsamen Mittagessen und auch privaten Abendessen habe ich sehr genossen. Bleibt weiterhin so ein bunter und lustiger Haufen!

Besonders hervorheben möchte ich Alisa Jost und Johannes Born. Ihr zwei habt mir täglich den Tag gerettet! Alisa, meine treue Sitznachbarin, Arbeitskollegin und auch Freundin. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich, egal ob privat oder arbeitsbezogen. Du konntest mich immer wieder aufbauen, wenn ich mal wieder verzweifelt vor meinen Daten saß (Stichwort: Nase 😊). Danke, dass du immer für mich da warst! Und Johannes: Danke, dass du so bist wie du bist! Du kannst mich immer zum Lachen bringen, egal wie trüb der Tag auch ist. Unsere gemeinsamen „Kaffeepausen“ waren täglich eins meiner Highlights.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung. Im Speziellen danke ich Michèle Baqué für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Der größte Dank geht jedoch an meinen Ehemann Nico. Danke, dass du mich immer unterstützt und mir zur Seite gestanden hast. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen.

15. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 04.09.2020

(Kerstin Völkner)